



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

CATÁLISIS CON METALES ALCALINOTÉRREOS EN HIDRÓLISIS DE ÉSTERES FOSFATO

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

OLGA TARAN IOUROVA



TUTOR: DR. ANATOLI K. IATSIMIRSKI

AÑO:
2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A Dr. Anatoli Iatsimirski por el apoyo, tiempo dedicado y conocimientos compartidos

A DGAPA por el apoyo económico para realización de este trabajo mediante los proyectos *DGAPA – PAPIIT IN 204805* y *IN 208901*

A los *miembros de jurado* por la revisión del manuscrito y los comentarios

A Hebert Jesús Estévez Rivera por la discusión general del trabajo

A la UNAM

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría

Este trabajo se desarrollo en el Laboratorio 213 de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química UNAM

Índice

Símbolos y Abreviaturas	5
Capítulo 1 Introducción	6
Capítulo 2. Antecedentes	8
2.1 <i>Mecanismos de ruptura de ésteres fosfato</i>	8
2.2 <i>Catálisis en sistemas biológicos</i>	14
2.2.1. <i>Estructura de sitios activos</i>	14
2.2.2. <i>Reacciones en sistemas biológicos selectos</i>	15
2.3 <i>Catálisis en sistemas artificiales con metales alcalinotérreos</i>	22
2.4 <i>Comportamiento de iones de metales alcalinotérreos en agua y en DMSO</i>	27
2.4.1. <i>Consideraciones generales</i>	27
2.4.2. <i>Estructuras cristalinas de solvatos de cationes de metales alcalinotérreos</i>	29
2.4.3 <i>Estructura de hidróxidos</i>	31
2.5. <i>Cálculos teóricos</i>	35
Capítulo 3. Objetivos del trabajo	37
Capítulo 4. Parte experimental	38
4.1. <i>Equipo</i>	38
4.2 <i>Reactivos</i>	39
4.3. <i>Síntesis</i>	40
4.4 <i>Cálculos</i>	41
4.5. <i>Mediciones cinéticas</i>	42
4.6 <i>.Estabilidad de las disoluciones</i>	44
4.7. <i>Titulaciones potenciométricas</i>	44
4.8 <i>Titulaciones conductimétricas</i>	46
Capítulo 5. Determinación de las especies activas	48
5.1 <i>Titulaciones potenciométricas</i>	48
5.1.1. <i>Mg²⁺</i>	49
5.1.2. <i>Ca²⁺</i>	51
5.1.3 <i>Sr²⁺</i>	53

5.1.4. Resumen y conclusiones de titulaciones potenciométricas.	56
5.2 Titulaciones conductimétricas	57
5.3 Estimación de la constante de unión al sustrato por RMN	65
Capítulo 6. Hidrólisis básica de los sustratos	69
6.1 Hidrólisis de ésteres fosfato en agua	69
6.2. Hidrólisis de ésteres fosfato a concentraciones de DMSO variables	71
Capítulo 7. Hidrólisis catalítica de los sustratos en agua	76
7.1 Hidrólisis de BNPP	77
7.1.1 Hidrólisis en presencia de iones Mg^{2+}	77
7.1.2 Hidrólisis en presencia de iones Ca^{2+}	80
7.1.3 Hidrólisis en presencia de iones Sr^{2+}	82
7.1.4 Energía de activación de la reacción de hidrólisis	83
7.2 Hidrólisis de HPNPP	86
7.3 Hidrólisis de PNPDP	88
7.4 Conclusiones sobre la hidrólisis catalítica en agua	89
Capítulo 8. Hidrólisis catalítica de sustratos en DMSO 90%	94
8.1 Hidrólisis de PNPDP	94
8.2 Hidrólisis de BNPP	97
8.2.1. Hidrólisis en presencia de iones Ca^{2+}	98
8.2.2. Hidrólisis en presencia de iones Sr^{2+}	100
8.2.3. Hidrólisis en presencia de iones Mg^{2+}	103
8.2.4. Determinación de la energía de activación de BNPP en DMSO 90%	105
8.3 Hidrólisis de HPNPP	108
8.3.1. Hidrólisis en presencia de iones Mg^{2+}	108
8.3.2. Hidrólisis en presencia de iones Ca^{2+}	110
8.3.3. Hidrólisis en presencia de iones Sr^{2+}	112
Capítulo 9. Factores que afectan el equilibrio de formación de las especies activas	115
9.1 Efectos de las sales neutras	115

<i>9.2 Efecto de ligantes orgánicos</i>	118
<i>9.3 Otros disolventes</i>	119
Capítulo 10. Desarrollo de un sistema catalítico con el uso de disoluciones amortiguadoras	120
<i>10.1 Selección de las disoluciones amortiguadoras</i>	120
<i>10.2 Hidrólisis de HpNPP en presencia de iones Sr^{2+} en buffers.</i>	124
<i>10.3 Hidrólisis de BNPP con metales alcalinotérreos y guanidinio</i>	125
<i>10.4 Estabilidad de la disolución.</i>	128
Capítulo 11. Discusión de resultados	129
<i>11. 1 Propuesta de un mecanismo</i>	129
<i>11.1.1 Hidrólisis de PNPPDPP</i>	129
<i>11.1.2 Hidrólisis de BNPP</i>	131
<i>11.1.3 Hidrólisis de HPNPP</i>	132
<i>11.1.4. Consideraciones generales de efecto de disolvente.</i>	134
<i>11. 2 Futuros proyectos.</i>	139
Capítulo 12 Conclusiones	143
Bibliografía	143
<i>Anexo 1</i>	146
Espectros de 1H RMN de sustratos HPNPP y PNPDP	
<i>Anexo 2</i>	146
Ajustes realizados con el programa Hyperquad2000 a las curvas de titulación potenciométrica de metales alcalinotérreos	

Símbolos y abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BNPP	bis(4-nitrofenil) fosfato
DMSO	disolvente dimetilsulfoxido
DMF	disolvente dimetilformamida
<i>I</i>	fuerza iónica
HPNPP	2-hidroxipropil-p-nitrofenilfosfato
K	constante de equilibrio en términos de concentración
K_{OH}	constante de formación de hidroxocomplejo
K_M	constante de Michaelis
<i>k</i>	constante de velocidad
k_{cat}	constante catalítica
k_{OH}	constante de velocidad de hidrólisis básica
k_{obs}	constante de velocidad observada
k_2	constante catalítica de segundo orden
nm	nanómetros
pK_a	constante de disociación ácida
PNPDPP	p-nitrofenil-difenilfosfato
R	coeficiente de linearidad obtenido por ajuste de cuadrados mínimos
S_N1	sustitución nucleofílica, mecanismo monomolecular
S_N2	sustitución nucleofílica, mecanismo bimolecular
TRIS	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propandiol
UV	ultravioleta
Vis	visible

Capítulo 1

Introducción

La hidrólisis catalítica de diésteres fosfato es uno de los campos de estudio más relevante de la química bioinorgánica moderna. La carga negativa que posee este tipo de moléculas sobre el oxígeno que se encuentra junto al átomo de fósforo, las convierte en una de las especies más estables hacia la hidrólisis. Debido a esto, los diésteres fosfato forman parte de cadenas poliméricas de ADN y ARN; almacenes del código genético de los seres vivos. La catálisis selectiva de esta reacción sería de gran ayuda en química bioinorgánica y en ingeniería genética, ya que podría existir una amplia aplicación en el estudio del ADN en organismos multicelulares. El uso práctico de estos catalizadores podría llevar a la obtención de tratamientos eficientes contra el cáncer. La elaboración de sistemas simples que mimeticen las reacciones atribuidas a las enzimas reales también es un problema de química prebiótica. En el caso de hidrólisis de ésteres fosfato, el descubrimiento de sistemas simples con alta eficiencia catalítica sería un paso más en la explicación de la evolución de los sistemas vivos a partir de simples cadenas de ácidos nucleicos en el primitivo “mundo del ARN”.

Un reto de la ciencia moderna es la creación de enzimas artificiales. En la actualidad se conocen con bastante precisión las estructuras internas de sitios activos de diversas enzimas. La reproducción exacta de una molécula sintética que cumpliera con todas las funciones de la enzima; la reacción o reacciones que se lleven a cabo dentro del organismo, así como la recepción de señales en el mismo, es poco realizable. Sin embargo, se han creado sistemas que simulan las reacciones biológicas de interés con rendimientos análogos o en algunos casos hasta superiores que en los encontrados en los sistemas biológicos.

En el diseño de un catalizador se seleccionaron los principios básicos de organización del centro activo de una enzima fosfoesterolítica: ambiente polar pero con bajo contenido de agua, constante dieléctrica del medio más baja que la del agua, presencia de los iones de metales alcalinotérreos o de zinc en forma de hidroxocomplejos.

Nuestro grupo de trabajo ha descubierto y descrito de manera cualitativa el sistema de hidroxocomplejos de metales alcalinotérreos en mezclas de DMSO – agua, los cuales aceleran la hidrólisis del fosfodiéster modelo bis-(*p*-nitrofenil)fosfato (BNPP) hasta 10^5 veces, en comparación con las velocidades observadas en agua. Lo relevante de resultados obtenidos es la aparente similitud del medio ambiente del sistema con los centros activos de las enzimas hidrolíticas. Sin embargo el mecanismo del sistema no era del todo conocido.

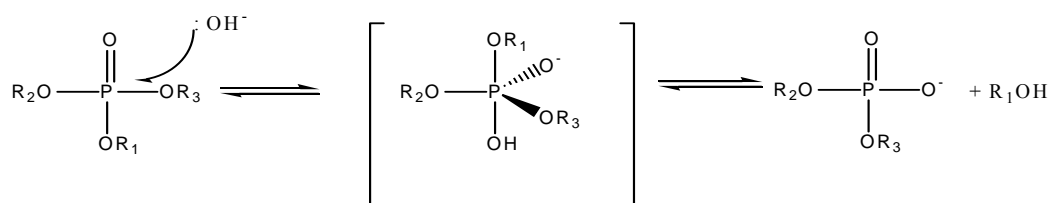
En el presente trabajo se estudian estos modelos catalíticos de una manera sistemática; caracterizando las especies responsables de la catálisis, considerando el efecto del disolvente, la fuerza iónica y el efecto de la adición de ligantes sobre la actividad fosfoesterolítica. En resumen, se elaboró un sistema estable con posibles aplicaciones, utilizando para ello amortiguadores apropiados en DMSO 90 % v/v.

Capítulo 2.

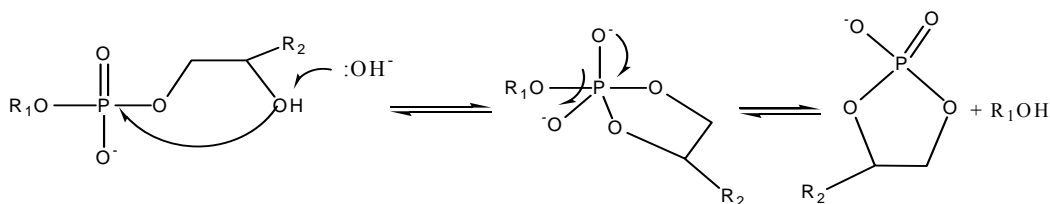
Antecedentes

2.1 Mecanismos de ruptura de ésteres fosfato

Los ésteres fosfato poseen el enlace $\overset{\ominus}{\text{O}}\text{P}(=\text{O})\text{—OR}$. Por la cantidad de sustituyentes sobre el fósforo se distinguen entre mono-, di- y triésteres fosfato. Los diésteres fosfato poseen estructuras más estables hacia la ruptura hidrolítica y son los que se encuentran en sistemas vivos como parte de las cadenas de ADN y ARN. Debido a la estabilidad de estos sustratos es posible tener la transmisión de la información genética de generación en generación. Los monoésteres fosfato forman parte de los sistemas vivos, como diversos intermediarios en los sistemas metabólicos. Los triésteres fosfato son menos estables que los di- y monoésteres. Ellos no pertenecen a los sistemas vivos y existen como base de diversos pesticidas y venenos neuroparalíticos.



Mecanismo general de hidrólisis básica de ésteres fosfato ($\text{R}_3=\text{H}$ para diésteres)



Mecanismo general de hidrólisis básica de β -hidroxil diésteres fosfato

Figura 2.1 Mecanismos de hidrólisis básica de diésteres y triésteres fosfato. ⁽¹⁾

El mecanismo de la hidrólisis de esta clase de compuestos fue estudiado con gran detalle en los años sesenta. ⁽²⁾ La catálisis por iones metálicos (que forman parte de los sitios activos de la mayoría de las enzimas) fue informada un poco antes en geles

formados con hidroxocomplejos de iones lantánidos.^(3,4) No fue hasta el inicio de los noventa, cuando un creciente interés por el tema produjo resultados de la catálisis por iones y complejos metálicos (sobre todo lantánidos) en disolución y entonces el mecanismo de esta reacción fue estudiado extensamente.^(1,4)

La ruptura del enlace del éster ocurre en el enlace P-O en los sistemas enzimáticos. Sin embargo, en los sistemas artificiales en las reacciones de ésteres alifáticos la ruptura puede ocurrir en el enlace C-O. La velocidad de hidrólisis, que en términos generales es una reacción de la sustitución nucleofílica, depende del pK_a del grupo saliente y la fuerza del nucleófilo. Para los diésteres fosfato aromáticos se encontró la correlación entre el pK_a del grupo saliente y la constante de hidrólisis espontánea⁽⁵⁾

$$\log k = 1.57 - 0.97 pK_a \quad (2.1)$$

Es difícil determinar una relación de actividad entre nucleófilos de diferente fuerza, ya que casi todos los experimentos de este tipo se han llevado a cabo con el ion hidróxido. Si se considera que la nucleofilia del hidróxido está relacionada con su basicidad, se puede observar una correlación lineal entre los valores de pK_a de diversos hidroxocomplejos metálicos y la constante de la hidrólisis promovida por estos compuestos. Sin embargo, esta correlación sólo es aplicable para grupos de compuestos que comparten el mismo ion metálico y ligantes de coordinación con estructuras semejantes.⁽⁴⁾ Además de que esta aproximación es bastante burda, ya que no se consideran los efectos estructurales de los catalizadores, los cuales también afectan la velocidad de la reacción.

Entre los ésteres fosfato de nuestro interés, los triésteres fosfato presentan el mecanismo de hidrólisis más simple. Los tres enlaces RO-P no permiten que haya la carga negativa sobre la molécula, por lo cual, el fósforo se vuelve más susceptible al ataque nucleofílico. La reacción se lleva a cabo mediante un mecanismo de adición-eliminación. El nucleófilo ataca directamente al fósforo, formando el intermediario pentacoordinado, llevando a una ruptura del enlace P-O, siendo el mejor grupo saliente el

que posee el pK_a más bajo (Figura 2.1).^(1,2,5) Se conoce la hidrólisis de los triésteres catalizada por diversos iones metálicos. Ya que todos los sitios de coordinación del fósforo están ocupados, el papel principal del metal en esta clase de catálisis corresponde a la activación del nucleófilo, es decir, a la formación del ion hidróxido coordinado al metal a partir de agua, ya sea a pH ácido o neutro. Algunos autores proponen que el metal puede estabilizar el estado de transición de la reacción.⁽⁶⁾ Sin embargo, en este caso es necesario admitir la existencia de ciclos de 4 miembros, los cuales son termodinámicamente inestables con respecto a los de 5 miembros, lo que no permite a este mecanismo ser el principal.

Los diésteres fosfato no cíclicos y sin el grupo β -hidroxilo logran mantener su estabilidad hacia la hidrólisis gracias a la carga negativa del grupo fosfato, que protege a los enlaces contra el ataque nucleofílico. El mecanismo de la hidrólisis que se presenta es nuevamente de adición –eliminación. El nucleófilo entrante se une al fósforo creando un intermediario de geometría bipirámide trigonal, posteriormente ocurre la ruptura de uno de los enlaces del diéster.^(1,2) Hasta la fecha se ha estudiado un gran número de diésteres fosfato, siendo el mejor conocido bis-(*p*-nitrofenil) fosfato (BNPP). En esta reacción el mecanismo catalítico de los iones metálicos implica la activación del nucleófilo a pH bajo mediante la formación de hidroxocomplejos, la estabilización del estado de transición, la neutralización de la carga sobre el fosfato, así como la estabilización del grupo saliente. La figura 2.2 muestra esquemáticamente diferentes tipos de catálisis por parte de iones metálicos. Normalmente en la reacción se presentan varios tipos de catálisis los cuales son difíciles de discriminar en el caso de iones metálicos cinéticamente lábiles. A veces, la reacción puede llevarse a cabo por dímeros de iones metálicos. En este caso la velocidad de reacción observada normalmente es mayor, debido a la cooperatividad entre los iones y a la aplicación simultánea de varios mecanismos de “activación” de hidrólisis.

Se estima que el enlace éster en el ADN presenta un tiempo de vida media de billones de años.⁽⁷⁾ Por otra parte, para el ARN este tiempo se reduce sólo a unos años. Esto se debe a la presencia del grupo β -hidroxilo en la molécula, Figura 2.3, que funciona

como el nucleófilo interno, además de que en este caso el anión hidróxido funciona como una base, desprotonando al grupo hidroxilo, y no como un nucleófilo, Figura 2.1.

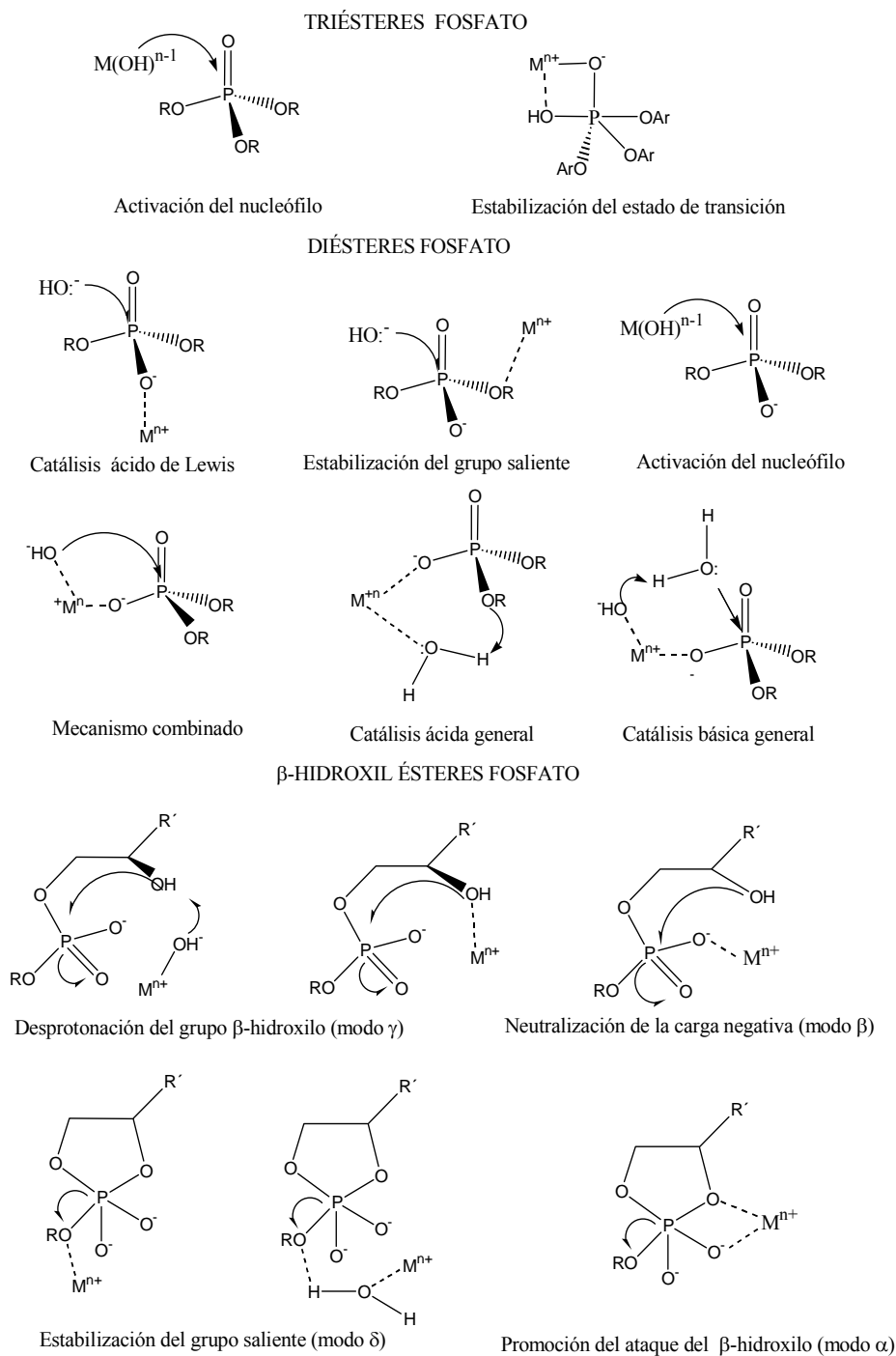


Figura 2.2. Catálisis de la ruptura de diésteres fosfato por iones metálicos. ^(1,8)

El paso limitante en este caso es el ataque intramolecular del nucleófilo. A los mecanismos catalíticos por parte de iones metálicos ocurrentes en sistemas biológicos se les ha asignado un orden en acuerdo a la aceleración esperada por el mecanismo correspondiente (Figura 2.2): α (10^0), β (10^5), γ o δ (ambos 10^6).⁽⁸⁾ En estos casos el metal participa en la deprotonación del 2-oxígeno (γ), la estabilización del grupo saliente (δ), la neutralización de la carga negativa sobre el fósforo (β) y la promoción del ataque 2-hidroxo al fosfato (α). En los sistemas vivos se utiliza una combinación de tres mecanismos de reacción, presentándose una aceleración de 10^{12} veces.

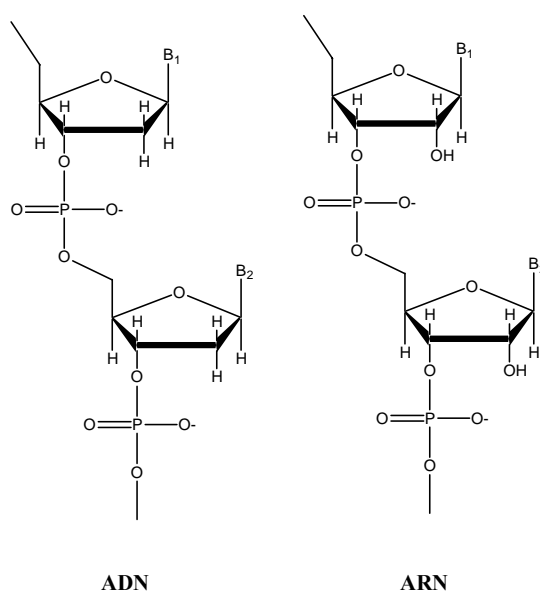
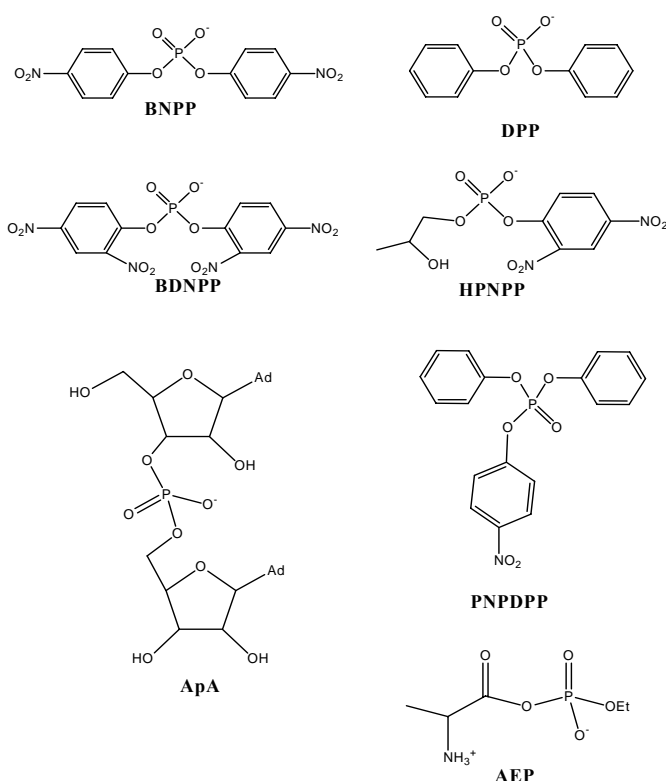


Figura 2.3. Diferencias estructurales del ADN y el ARN.

De los resultados de la Tabla 2.1 se puede observar la diferencia en rapidez de la hidrólisis entre diésteres y triésteres (ver Figura 2.4 para las estructuras de sustratos), al igual que la dependencia del grupo saliente. Además se observa, que la rapidez de hidrólisis básica en el caso de triésteres y β -hidroxil diésteres es más elevada que para los simples diésteres fosfato, donde el enlace está protegido por una carga negativa.

Tabla 2.1 Constantes de velocidad de la hidrólisis acuosa y alcalina para diferentes sustratos a la temperatura de ambiente.

Sustrato	Abreviatura	$k_{H_2O} s^{-1}$	$k_{OH^-} M^{-1} s^{-1}$	Ref
bis – (2,4-dinitrofenil) fosfato	BDNPP	1.8×10^{-7}	3×10^{-3}	9a
bis –(<i>p</i> – nitrofenil) fosfato	BNPP	1.1×10^{-11}	5.8×10^{-6}	9b
Difenilfosfato	DPP	Demasiado lenta para medirse	7×10^{-6} (a 75° C)	9c
Acido desoxiribonucleico	ADN	$\leq 1 \times 10^{-16}$	$\approx 1 \times 10^{-10}$	7
Alanin etil fosfato	AEP	3.9×10^{-5} zwitterion $1.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ catión	1.67	10
2-hidroxiopropil- <i>p</i> -nitrofenil fosfato	HPNPP	2.8×10^{-8} (valor estimado)	0.0672	9e
adenosin-adenosin diribonucleótido	APA		0.033	9f
<i>p</i> -nitrofenil difenilfosfato	NPDPP	9.7×10^{-7} 5% Dioxano	0.35 5% Dioxano	9h

**Figura 2.4** Ésteres fosfato comúnmente utilizados en experimentos cinéticos.

Existen otros mecanismos de hidrólisis de ésteres fosfato, por ejemplo para diésteres cíclicos y monoésteres. Sin embargo estos no están considerados en este trabajo.

2.2 Catálisis en sistemas biológicos

2.2.1. Estructura de sitios activos

Para lograr entender mejor por qué se ha elegido un estudio detallado con metales alcalinotérreos, los cuales han demostrado ser pobres catalizadores en sistemas artificiales,⁽¹⁾ es necesario entender el papel que toman estos metales en los sistemas vivos, conocer su ambiente y los mecanismos de reacción que presentan.

A diferencia de Sr^{2+} y Ba^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} son dos elementos de gran importancia biológica.⁽⁵¹⁾ Su concentración en el cuerpo humano llega a ser de 1 mM, además de que participan en diversos procesos bioquímicos en los sistemas vivos, sobre todo como cofactores en múltiples enzimas, entre ellos las reacciones hidrolíticas: el Mg^{2+} forma parte de nucleasas y ATPasas, mientras que el Ca^{2+} participa como cofactor en peroxidasas, amilasas y muchas otras enzimas.

Estos metales actúan como ácidos de Lewis duros y llegan a ser inertes hacia los procesos redox. Su química en disolución será discutida más adelante con detalle. El análisis detallado del ambiente electrónico y estérico de estos iones en los sitios activos conocidos de diversas enzimas permite proponer varias generalidades.⁽¹¹⁾ El ion Mg^{2+} en los sitios activos de las enzimas prefiere unirse al oxígeno, posee cierta afinidad al nitrógeno y una preferencia mucho menor a los otros ligantes. Siempre está unido a un carboxilato de ácido Aspártico o Glutámico. Su afinidad a los aminoácidos sigue la siguiente tendencia: Asp/Glu>carboxilatos de la cadena > Ser/Thr>His>Tyr. En las nucleasas el Mg^{2+} tiende a unirse a los ácidos nucleicos, sin embargo, no lo hace de manera directa, sino mediante un puente de agua. La afinidad al agua para este catión es alta; aún en los sitios activos de las enzimas, los cuales se consideran deficientes en agua, Mg^{2+} posee varios sitios de coordinación ocupados por agua. Las simulaciones teóricas

señalan que en el medio con menor constante de permitividad dieléctrica los iones metálicos poseen una mayor afinidad a sitios más hidrofílicos, por lo cual, dentro del sitio activo de una enzima el metal se encuentra unido a un sitio hidrofílico y rodeado de un medio hidrofóbico. Los cálculos teóricos también proponen que la esfera de coordinación no puede albergar más de tres ligantes aniónicos. El número de coordinación total para este ion es constante e igual a 6. Curiosamente, los sitios activos de todas las enzimas que utilizan Mg^{2+} no son muy afines a él y pueden sustituirse fácilmente por otros cationes. Esto se explica parcialmente en virtud de la alta concentración intercelular de Mg^{2+} (en promedio 0.5 mM) en comparación con la de otros iones en el organismo, de tal forma que estos sitios no tienen que ser selectivos para este catión.

El ion Ca^{2+} no es tan duro como el Mg^{2+} , y su afinidad a los aminoácidos en el sitio activo de una enzima va en el siguiente orden: carboxilatos (se unen como ligantes bidentados) > carbonilos > agua > hidroxilo. Su número de coordinación varía de 6 a 8. Este catión no es tan afín al agua como el Mg^{2+} . A diferencia de Mg^{2+} los sitios de coordinación de Ca^{2+} en las enzimas llegan a ser muy afines a él.

Los iones de Sr^{2+} y Ba^{2+} no son iones biológicos, por lo cual no existe información sobre su coordinación y solvatación en las enzimas.

2.2.2. Reacciones en sistemas biológicos selectos

A continuación se presentan varios tipos de enzimas que hidrolizan ADN y ARN en células. Sus funciones son distintas: reparación del ADN, superenrollamiento, ataque al ADN viral, trabajo con ARN. La mayoría de estas enzimas utilizan Mg^{2+} en el sitio activo, aunque a veces también trabajan con Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} . La hidrólisis puede llevarse a cabo utilizando de 1 a 3 iones metálicos. Las enzimas que presentan un solo ion metálico, tales como la nucleasa de estafilococo, funcionan mejor con el ion Ca^{2+} , mientras que el ion Mg^{2+} es más utilizado en las enzimas con varios iones metálicos.⁽¹²⁾ Algunos metales pueden no participar directamente en la catálisis, y llegan a estar presentes como factores alostéricos.

Endonucleasa restrictiva tipo II. ⁽¹³⁾

Este tipo de enzimas existe en células procarióticas. Su misión es hidrolizar rápidamente todo el ADN ajeno que llega a la célula. Combinan el aumento de constante de hidrólisis acuosa unas 10^{16} veces con alta selectividad hacia los sitios del ADN en cuestión: al cambiar más de 2 pares de nucleótidos en la secuencia la actividad decae rápidamente. Las endonucleasas trabajan junto con las metilasas, enzimas que metilan el ADN de la célula, protegiéndolo de esta manera de las endonucleasas. Es una de muchas enzimas que utiliza dos iones Mg^{2+} en su sitio activo. El interés particular en este sistema consiste en la cooperatividad entre el sitio activo y los iones de Ca^{2+} que están fuera.

Hasta la fecha se conocen por lo menos 14 estructuras cristalinas de endonucleasas de células diferentes. Todas presentan estructura típica de conformación β hecha de 5 cadenas rodeadas de 2 hélices, las cuales contienen elementos necesarios para reconocer y cortar el ADN. Las secuencias de aminoácidos varían mucho de unas enzimas a otras, sin embargo, en todos los casos se observan tres sitios de carga separados en cada sitio activo.

La catálisis se lleva a cabo en presencia de iones Mn^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} . La actividad catalítica de estos iones no se relaciona precisamente con los pK_a de los metales ($Mn^{2+} > Mg^{2+} \approx Co^{2+}$). Para cada enzima se utiliza la misma secuencia catalítica, que incluye unión no específica al ADN, transferencia al sitio requerido del ADN (la selectividad de las enzimas aumenta considerablemente en presencia de una pequeña concentración de Ca^{2+}), la reorganización de la enzima y el ADN para llevar a cabo la catálisis, la unión del metal al ADN, la transferencia del fosforilo y la salida del producto (Figura 2.5).

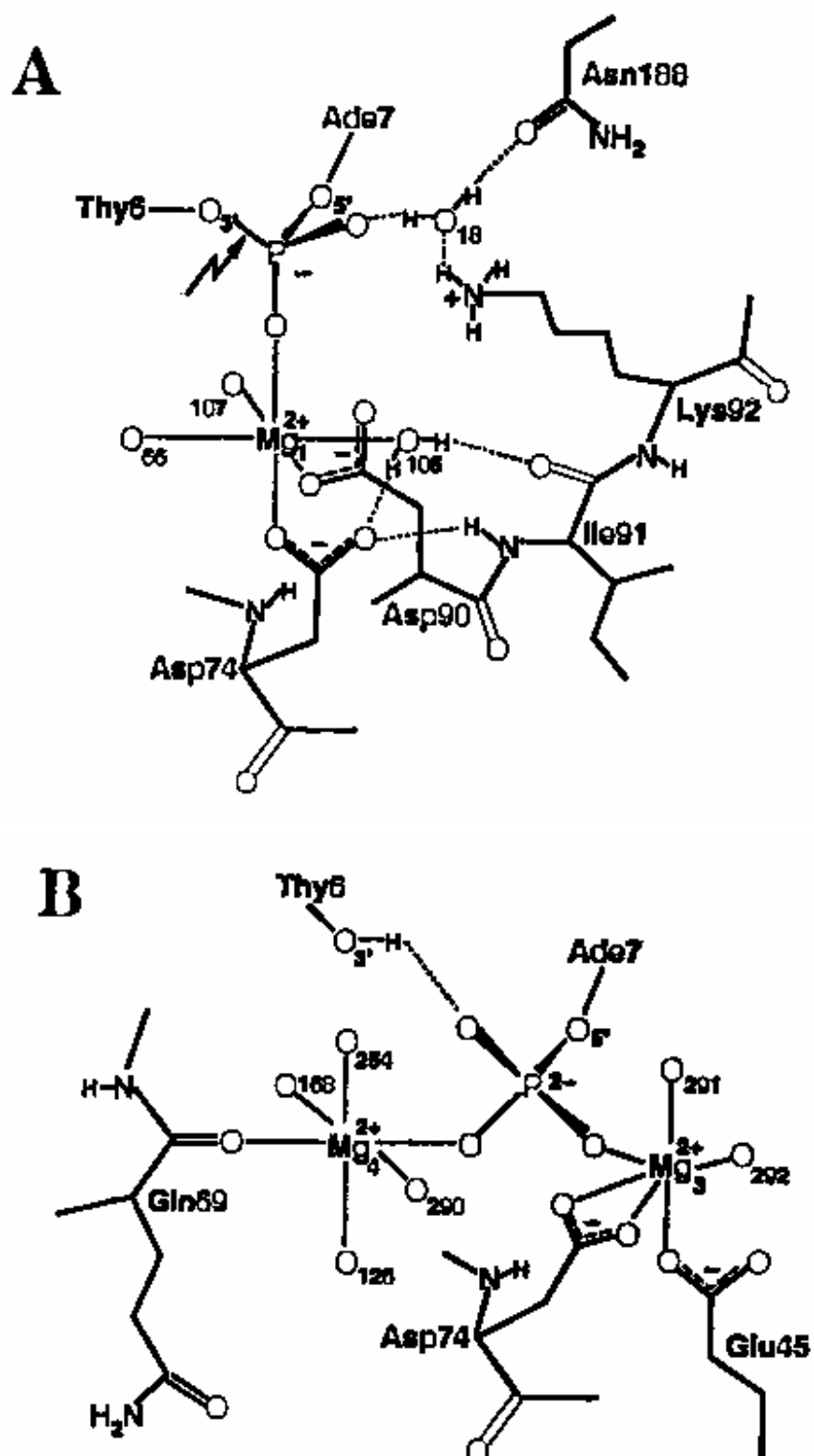


Figura 2.5. La estructura de la endonucleasa al unirse al sustrato (A) y después de reagruparse para llevar a cabo la catálisis (B).⁽¹⁴⁾

La unión de la enzima al ADN tiene una K_d de 10^{-9} a 10^{-12} M y aunque los iones Ca^{2+} no participan directamente en la catálisis, un ion grande y positivo de este tipo crea un escudo entre los carboxilos de la enzima y los fosfatos del ADN, aumentando de esta manera la constante de unión 10^3 veces. El sitio activo de la enzima tiene 2 iones metálicos y probablemente actúe como ADN polimerasa I o una fosfatasa alcalina, aunque no se conoce la combinación de metales necesaria para llevar a cabo la catálisis. Las cadenas de ADN se cortan mediante el mecanismo S_N2 empleando el ataque al fosfato tetraédrico y su conversión a bipirámide trigonal con el OH^- entrante y oxígeno 5' saliente en posiciones axiales. Se propone un mecanismo de unión directa del metal al diéster fosfato, aunque existen todavía varios factores sin explicar.

Ribozimas⁽¹⁵⁾

Las ribozimas no son exactamente enzimas. Son fragmentos de ARN capaces de realizar hidrólisis de si mismas en una región específica. Se cree, que los primeros sistemas vivos utilizaban ribozimas en vez de enzimas a base de proteínas. Sin embargo, la transición de catalizadores a base de ARN a catalizadores protéicos todavía no está explicada. La *Hammerhead Ribozyme* es una de las ribozimas mejor estudiadas.

Tabla. 2.2 Algunas ribozimas conocidas y los iones metálicos que las activan.⁽¹⁶⁾

Ribozima	Iones metálicos requeridos	Constantes aparentes de unión del metal, $K_{1/2}$
Intron Grupo I de Tetrahemena	Mg^{2+} , Mn^{2+}	0.5 mM para Mg^{2+}
Ribozima de Tetrahemena	Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}	
Hammerhead Ribozima	Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} o Sr^{2+} en presencia de poliaminas	> 3 mM para Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}
Virus de Hepatitis delta humano	Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}	> 0.3 mM para Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}
Hairpin ribozyme	Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}	3 mM para Mg^{2+} , 10 mM Sr^{2+} , 20 mM para Ca^{2+}
RNasa de P ARN	Mg^{2+} o Mn^{2+} con poliaminas	36 mM para Mg^{2+}

La ribozima, al igual que la mayoría de las enzimas requiere del cofactor metálico para llevar a cabo la reacción. En los sistemas vivos se utiliza el ion Mg^{2+} , aunque la actividad se conserva parcialmente si este ion es cambiado por Mn^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} o Pb^{2+} (Tabla 2.2).

La reacción de hidrólisis de ARN se lleva a cabo mediante el mecanismo de $SN_2(P)$ ^(17a) donde el oxígeno 2' entrante está en línea con el oxígeno del grupo 5' saliente. El ion metálico se une al oxígeno cargado negativamente para así neutralizar la carga y facilitar el ataque nucleofílico. Experimentos de titulación han demostrado que una sola desprotonación es necesaria para que la reacción se lleve a cabo. Para esto el metal puede realizar el papel de la base general (permitiendo que el hidróxido unido a él desprotona el O-2') o de una base específica proveniente de una molécula del disolvente. Además, el metal puede estar fuera de la esfera de coordinación sin participar directamente en la catálisis, como lo propone Cowan. ^{(17 (b))} La Figura 2.6 muestra posibles mecanismos de participación del Mg^{2+} en catálisis.

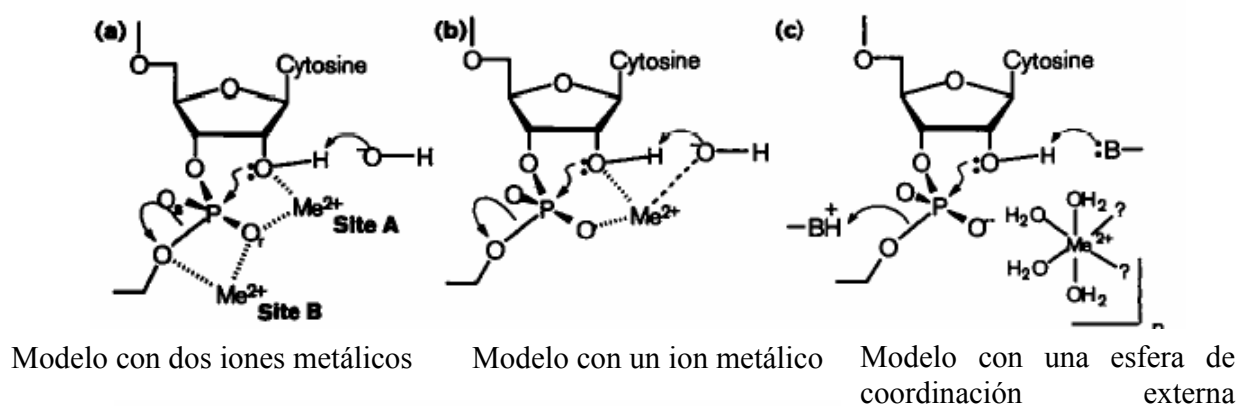


Figura 2.6. Posición probable de Mg^{2+} en ribozimas ^{17(b)}.

A pesar de que las ribozimas se conocen por más de 20 años, la estructura exacta de su sitio activo permanece desconocida. Todavía no se sabe cuantos iones de Mg^{2+} tiene que poseer la ribozima, pero probablemente tiene que ser más que uno, ya que uno de los iones metálicos ayuda a estabilizar la configuración del ARN para su posterior reacción, mientras que el otro catión se requiere para neutralizar la carga sobre el fósforo. También se requieren iones metálicos para estabilizar al grupo saliente, ya sea de manera

directa o acercando una molécula de agua lo suficiente para que esta pueda donar el protón.

Por otra parte, uno de los cálculos teóricos llevados a cabo recientemente^(17a) sugiere la posibilidad de que sea un solo ion Mg^{2+} para que se lleve a cabo la reacción, pasando por un intermediario muy inestable de geometría bipirámide trigonal con los oxígenos 5' y 2' en la posición axial, siendo el paso limitante la separación del grupo saliente. El papel del ion metálico en este caso sería el de neutralizar la carga negativa sobre el fósforo, el acercamiento del hidróxido para actuar como base sobre el grupo 2'-OH, y el acercamiento de una molécula del agua al grupo saliente, para ofrecerle el protón y así facilitar su salida.

Las ribosimas son de gran interés para nuestro trabajo, ya que son los sistemas enzimáticos más simples que se conocen y requieren de la presencia de metales alcalinotérreos. Aunque trabajan también con metales de transición, la química sencilla de los metales alcalinotérreos es suficiente para llevar a cabo la catálisis, lo que indica, que estos metales tal vez puedan trabajar en los sistemas aun más simples, como lo es la propuesta en el presente trabajo.

Nucleasa del estafilococo⁽¹⁸⁾

Una de las enzimas hidrolíticas más sorprendentes es la nucleasa del estafilococo. Esta enzima presenta sólo un átomo metálico en su sitio activo y es el átomo de Ca^{2+} . Sin embargo, la gran cooperatividad entre el ion metálico y los aminoácidos polares que lo rodean permite aumentar la velocidad de la hidrólisis de ADN unas 10^{16} veces (ya que la hidrólisis no catalizada de ADN sigue sin ser bien establecida, este número pudiera ser tan grande como 10^{25} veces) que es el límite de aceleración de la reacción conocido hasta la fecha.

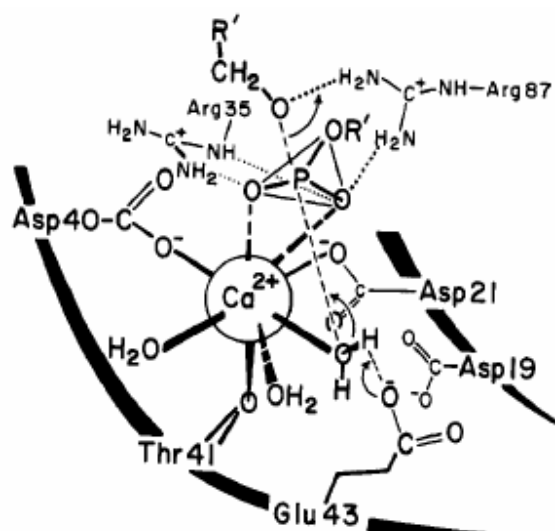


Figura 2.7. Estructura del sitio activo y mecanismo de reacción de la nucleasa del estafilococo.⁽¹⁸⁾

Como en la mayoría de los casos, se espera un mecanismo asociativo con la salida del grupo 5'-OH, desplazado por el nucleófilo hidróxido, siendo éste el paso limitante, pasando por el estado de transición de bipirámide trigonal (Figura 2.7). Se cree que el metal junto con Arg-87 contribuyen a la estabilización del estado de transición. La reacción se lleva a cabo por un mecanismo ácido-base concertado, realizado por Arg-87 y Glu-43, respectivamente. Los estudios con una enzima mutada revelaron que la catálisis por parte del ion metálico provee una aceleración alrededor de 10^9 veces, atribuyendo el resto a la contribución de los aminoácidos. El nucleófilo proviene de agua coordinada al metal, que se desprotona por el Glu - 43, mientras que el grupo saliente se estabiliza por el protón de Arg - 87, que al mismo tiempo junto con Arg - 35 y el ion metálico estabilizan el estado de transición.

La selectividad de la enzima hacia el ion Ca^{2+} es tal que la sustitución del ion Ca^{2+} por cualquier otro ion (por ejemplo Mn^{2+}) lleva a la inhibición de la enzima. Esta enzima es de sumo interés, debido a su alta eficiencia y al uso de calcio como cofactor. También hay que subrayar la alta cooperación de los aminoácidos - un mecanismo que difícilmente puede ser repetido en enzimas artificiales.

Fosfotriesterasas^(19, 21)

Como ya se ha dicho, los triésteres fosfato no están presentes en los sistemas vivos. Sin embargo, se ha encontrado grupo de enzimas que pueden hidrolizar los triésteres fosfato sintéticos – probablemente, estas ayudan a los organismos vivos a protegerse de pesticidas y venenos a base de triésteres fosfato. Se llaman fosfotriesterasas y también requieren de iones metálicos para su actividad.

Utilizan los iones de metales de transición. La enzima mejor caracterizada *Pseudomonas diminuta*, presenta por lo menos 2 iones de Zn^{2+} por cada de sus unidades (es un homodímero con 39 kDa por unidad). El sitio activo presenta un átomo de Zn^{2+} de coordinación tetraédrica expuesto al disolvente, mientras que el segundo átomo es pentacoordinado y más protegido. Los átomos están unidos entre si por una molécula de disolvente (hidróxido) y un carboxilato. La reacción ocurre gracias a la coordinación del sustrato al metal tetraédrico, con el posterior ataque del ligante hidróxido unido al otro ion metálico. Las histidinas que rodean el sitio activo probablemente funcionan como bases generales para activar las moléculas de agua y producir hidróxido.

Aunque el mecanismo de hidrólisis básica de triésteres fosfato es el más simple de los conocidos, la hidrólisis catalizada por iones metálicos es de gran complejidad, requiriendo diferentes geometrías de las esferas de coordinación de iones metálicos. En esta tesis se utiliza un triéster fosfato para aclarar ciertos puntos del mecanismo de hidrólisis de diésteres, pero como se verá, los metales alcalinotérreos son incapaces de llevar a cabo una hidrólisis eficiente de estos sustratos.

2.3 Catálisis en sistemas artificiales con metales alcalinotérreos

En los sistemas fosfoesterolíticos artificiales los iones de los metales alcalinotérreos no juegan el papel tan importante como en sistemas naturales. Esto se debe principalmente a su pK_a alto, ⁽²⁰⁾ que impide la formación de hidroxocomplejos – las especies activas, a pH neutro en medio acuoso, donde se llevan a cabo normalmente este

tipo de reacciones. Por otro lado, la simplicidad observada en la química de coordinación de estos iones metálicos impide unirlos a ligantes que de alguna manera podrían mejorar su desempeño.

Actualmente los iones lantánidos se consideran los mejores catalizadores del proceso.⁽¹⁾ Esto se debe principalmente a sus pK_a 's bajos, lo que permite la formación de hidroxocomplejos aún en el medio con un pH ácido. Además, los iones de lantánidos son capaces de formar dímeros en agua, los cuales actúan mejor que las especies monoméricas. La desventaja de los iones lantánidos es su alta toxicidad, lo que dificulta su posible aplicación *in vivo*. Aparte de los lantánidos, se han estudiado de manera extensa diversos complejos de metales de transición, sobre todo debido a que la mayoría de ellos son elementos de importancia biológica.^(4,8)

La actividad catalítica del ion Mg^{2+} fue estudiada extensamente debido a su importancia en procesos biológicos. Se ha aplicado con ADN y ARN natural y con sustratos modelo artificiales. En sistemas con ADN natural se han informado varios resultados interesantes.

El complejo de Mg^{2+} con dietilentriamina (dien) informada por Yang et. al.⁽²²⁾ en 2004 es capaz de promover la hidrólisis del ADN súperenrollado a pH 8 y 37°C con una constante de velocidad observada de $4.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ que corresponde a una aceleración alrededor de 10^8 veces (la concentración del metal utilizada en este caso era de 0.17 mM).

Por otra parte Komiyama en 2002⁽²³⁾ estudió cualitativamente la hidrólisis de trirribonucleótidos a pH 7.3 y 50°C en presencia de metales alcalinotérreos. Después de 90 horas de reacción la conversión de sustrato ApA fue de 15% para los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , 2% para el ion Sr^{2+} y 4% para el Ba^{2+} . Para 1 M de Mg^{2+} las constantes observadas fueron de orden $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, lo que da un aumento en la rapidez de la reacción de alrededor de 70 veces en comparación con la reacción no catalizada. En este caso la reacción se vio inhibida por la presencia de metales alcalinos.

El ion Mg^{2+} permite hidrolizar alrededor de 60 % tRNA⁽²⁵⁾ de la levadura en 10 horas a pH 8.5 y 37°C, siendo la especie activa el monohidróxido del metal.

Los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} fueron utilizados en 1992 por grupo de J. Morrow para hidrólisis de HpNPP⁽²⁴⁾ – un análogo del ARN, a pH 6.5 y 37°C, dando un aumento de la velocidad de la reacción alrededor de 10 veces en presencia de 0.05-0.1 M de catión metálico. Sin embargo, la poca eficiencia de la catálisis se debió a que a pH 6.5, donde se llevó a cabo la reacción, la concentración de especies activas (MOH^+) es muy baja. Las constantes de segundo orden para las especies activas calculadas a partir de estos datos, son $3 M^{-1} s^{-1}$ para el ion Mg^{2+} y $17 M^{-1} s^{-1}$ para el ion Ca^{2+} , lo que hace a estos compuestos unos de los mejores catalizadores conocidos para el sistema. El efecto catalítico no fue notado ya que puede apreciar sólo a pH elevados, donde están presentes las especies MOH^+ en concentraciones considerables. Las de las reacciones, en cambio, se llevan a cabo a pH neutro, que corresponde al pH de la mayoría de los sistemas vivos.

Aunque en los sistemas vivos el Mg^{2+} normalmente reacciona como dímero, sólo se conoce una estructura sintética de dímero de Mg^{2+} artificial. ⁽²⁶⁾ Es el complejo dinuclear de Mg^{2+} con un ligante derivado de *m*-xililenediamina, (Figura 2.9) hay que notar que el compuesto se une a los diésteres fosfato, conforme al modelo de enzimas dinucleares de Mg^{2+} . Sin embargo, las actividades hidrolíticas de este sistema no se han medido.

Los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} fueron utilizados con otro sustrato activado, el alanil etil fosfato.⁽¹⁰⁾ Sin embargo, la catálisis observada en este caso fue muy baja. A pH 7.0 y 25°C se presentó la saturación al aumentar la concentración del metal. La razón de k_{obs}/k_o a saturación fue de 50 para Mg^{2+} y 45 para el Ca^{2+} .

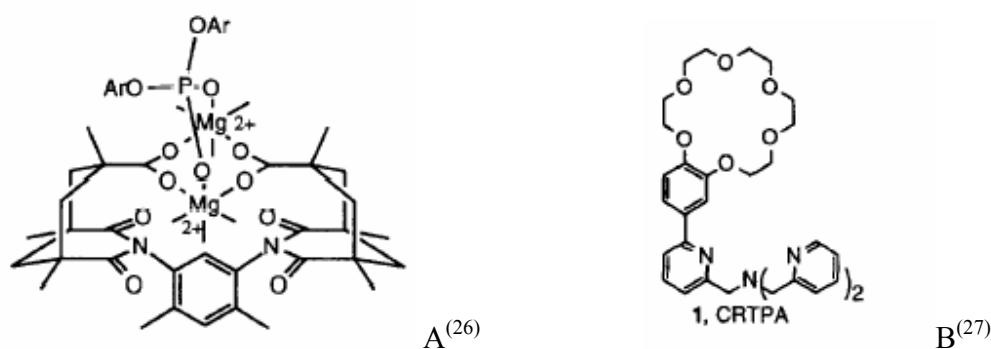


Figura 2.9. Complejos sintéticos de metales alcalinotérreos de uso catalítico.

Los dos restantes iones de los metales alcalinotérreos; Sr^{2+} y Ba^{2+} casi no se han ocupado en este tipo de experimentos. Aparte de la hidrólisis de oligorribonucleótidos realizada por Komiyama, ⁽²³⁾ sólo se conoce el complejo supramolecular bimetálico de CRTPA (Fig. 2.9) con Sr^{2+} y Zn^{2+} que puede acelerar la hidrólisis de BNPP 1120 veces a pH 8.5 y 50°C y 20% de DMSO. ⁽²⁷⁾

Anteriormente, ⁽²⁸⁾ nuestro grupo de trabajo estudió el efecto de metales alcalinotérreos sobre la hidrólisis básica del sustrato análogo de ADN, bis(*p*-nitrofenil)fosfato (BNPP) en agua a 70°C. La aceleración observada fue de 3 a 10 veces para 30 mM de metal en presencia de 0.075 M hidróxido en la disolución. Las constantes de segundo orden a partir de las constantes de formación de especies activas (monohidroxocomplejos) fueron $8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Mg^{2+} , $0.051 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Ca^{2+} y $0.016 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Sr^{2+} .

Un estudio preliminar reveló que la constante de segundo orden para estos metales es alta, por lo que en condiciones donde la concentración de hidroxocomplejos de estos iones, fuera elevada, ocurriría una catálisis satisfactoria. Debido a los altos valores de pK_a y a la baja solubilidad de los hidróxidos metálicos, estas condiciones son experimentalmente inalcanzables en agua. Sin embargo es posible que la presencia de co-disolventes orgánicos pudiera promover la formación de los hidroxocomplejos debido al fortalecimiento de interacciones interiónicas en medios de menor polaridad. Además es posible estabilizar estas especies debido a la fuerte solvatación de iones metálicos con disolventes dipolares apróticos como DMSO o DMF. Probablemente estos efectos contribuyen también a la alta actividad catalítica de estos metales en los sitios activos de las enzimas.

En mi trabajo de licenciatura se informó que la velocidad de hidrólisis de BNPP en presencia de los hidróxidos de metales alcalinotérreos al cambiar el medio de agua por DMSO acuoso 90% v/v, aumentaba hasta 10^5 órdenes de magnitud. ^(28, 29) El efecto de disolvente fue estudiado en términos del cambio de constante de permeabilidad

dieléctrica, acidez y basicidad del medio. Las especies activas fueron caracterizadas por titulaciones potenciométricas

Los problemas que se encontraron en este caso, fueron la baja reproducibilidad de los resultados (aunque muy altas las velocidades, éstas variaban hasta 10 veces de una corrida a otra), así como la baja estabilidad del sistema catalítico y un extraño efecto promotor de metales alcalinos sobre la actividad catalítica en el sistema con cloruro de magnesio - hidróxido que nunca se pudo explicar satisfactoriamente.

Tabla 2.3 Velocidad e hidrólisis de BNPP en DMSO 90% .⁽²⁹⁾

	(<i>n</i> -Bu) ₄ - NOH mM	NaOH mM	NaCl mM	MgCl ₂ mM	CaCl ₂ mM	SrCl ₂ mM	<i>k</i> _{obs} , s ⁻¹
1	5						4.5×10^{-8}
2	30						5.1×10^{-7}
3		5					1.7×10^{-6}
4		30					1.1×10^{-5}
5	30		5				2.0×10^{-6}
6	30		30				1.3×10^{-5}
7	5			2			1.7×10^{-5}
8		5		2			1.0×10^{-3}
9	5		5	2			8.4×10^{-4}
10	2				1		6.0×10^{-5}
11		2			1		3.9×10^{-5}
12	2					1	1.0×10^{-3}
13		2				1	4.9×10^{-4}

Las constantes de velocidad de hidrólisis de BNPP observadas en la reacción fueron comparables con los valores obtenidos en presencia de lantánidos.⁽¹⁾ La ventaja del sistema es la actividad elevada de los iones Ca²⁺ y Mg²⁺: metales presentes en sistemas biológicos.

En el presente trabajo la actividad de los iones metálicos fue elevada por un cambio del medio. La aparente sencillez del método sugiere facilidad de uso en futuras aplicaciones. Se demostró, que no es necesario un diseño complejo de los ligantes para llevar a cabo la reacción. Sin embargo, la caracterización completa de todos los componentes fue necesaria. Esto implica un estudio más extenso del sistema encontrado.

2.4 Comportamiento de iones de metales alcalinotérreos en agua y en DMSO

2.4.1. Consideraciones generales

En el presente trabajo, las disoluciones de metales alcalinotérreos fueron estudiadas en agua y mezclas de DMSO y agua. El ambiente de solutos en ambos casos varía significativamente. Para evaluar el efecto del cambio de disolvente, se toma en cuenta el cambio de la energía libre de los iones al pasar de agua a un medio diferente, que puede ser otro disolvente puro o una mezcla de disolventes. Existen muchos trabajos que consideran este fenómeno.⁽³⁰⁾ El cambio del potencial químico del ion se expresa mediante la ecuación (1.2).

$$\mu_i^S = \mu_i^0 + RT \ln^0 \gamma_i^S \quad 1.2$$

En general, los cationes al pasar de agua a un disolvente dipolar aprótico (y además básico, como lo es el DMSO) se estabilizan por el disolvente y su energía libre baja. Los aniones se desestabilizan, lo que eleva su energía libre. Las moléculas neutras y moléculas grandes con carga muy dispersa prácticamente no cambian su energía. El cambio se presenta como el coeficiente de actividad de la sustancia ${}^0\gamma_i^S$ o el correspondiente cambio de la energía libre estándar que afecta el valor de potencial químico.

El efecto catalítico del medio en procesos con reactantes iónicos, al pasar una reacción de agua a DMSO, se debe principalmente a la desestabilización de los reactivos aniónicos, que lleva a la disminución de la energía requerida para llegar al estado de transición (Figura 2.11).

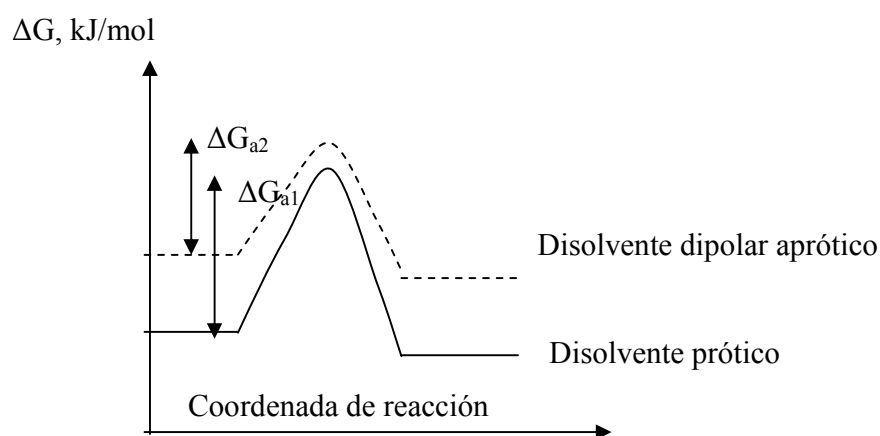


Figura 2.11 Efecto catalítico al cambiar el medio de agua a un disolvente dipolar aprótico.

La Figura 2.11 esquematiza este tipo de efecto y la Tabla 2.4 representa valores informados para los metales alcalinotérreos e hidróxido al pasar de agua a DMSO. ^(31a,b)

Tabla 2.4. Energías libres de transferencia de iones de metales alcalinotérreos, protón e hidróxido de agua a DMSO. ^(31a,b)

<i>Ion</i>	<i>$\Delta G, \text{kJ/mol}$</i>
Mg^{2+}	-13
Ca^{2+}	-13
Sr^{2+}	-14
Ba^{2+}	-25.1
H^+	-5.73
OH^-	8.8

Este enfoque describe el efecto general, sin tomar en cuenta las geometrías y otras propiedades de las moléculas del disolvente y tratando a éste como un medio continuo. Sin embargo, las moléculas del disolvente interactúan a nivel molecular con el ion metálico, formando su esfera de coordinación primaria y secundaria, determinando así los sitios del ion disponibles para llevar a cabo la reacción de interés. Para un estudio exhaustivo es necesario conocer la estructura de los iones solvatados.

2.4.2. Estructuras cristalinas de solvatos de cationes de metales alcalinotérreos

Se han caracterizado las estructuras cristalinas de todos los cationes de los metales alcalinotérreos solvatados, tanto por agua como por DMSO. Es probable, que las especies cristalinas tengan la estructura análoga a las especies que se encuentran en disolución. Todavía no se conoce bien si estas estructuras corresponden a las especies presentes en soluciones concentradas o diluidas, sin embargo, conocer las estructuras cristalinas de los solvatos puede dar información útil para un futuro análisis de los resultados.

Los iones de magnesio siempre presentan el número de coordinación 6, formando con el disolvente un octaedro distorsionado y situando los contraiones correspondientes en la segunda esfera de coordinación. El análisis de estructuras de Mg^{2+} solvatado por DMSO se llevó a cabo por difracción de los rayos X en estado sólido⁽³³⁾ y LAXS (low angle X-ray scattering) en disolución.⁽³⁴⁾ En ambos casos el ion Mg^{2+} resultó estar coordinado con 6 moléculas de DMSO a través del átomo de oxígeno, en forma de octaedro distorsionado.⁽³⁵⁾ Las estructuras determinadas a partir de difracción de los rayos X en cristales sólidos indican una distancia Mg-O promedio de 2.063 Å y los ángulos Mg-O-S de 128.2, 133.7 y 143.9° que son característicos para compuestos de coordinación de Mg^{2+} . Los experimentos de LAXS no presentan el número de coordinación, sólo distancias interatómicas, siendo estas 2.07 Å para Mg-O, 3.248 Å para Mg-S con el ángulo M-O-S igual a 130°. El contraion de Mg^{2+} en los experimentos realizados fue el perclorato que es un ligante muy débil, por lo cual fue desplazado por DMSO y se encontró en la segunda esfera de coordinación.

Todas las estructuras del ion Mg^{2+} en diferentes soluciones presentan coordinación octaédrica. Debido a que el Mg^{2+} es un catión duro, se coordina mejor con disolventes donadores de oxígeno que con los donadores de nitrógeno o algún otro átomo. Las estructuras de Mg^{2+} hidratado presentan un octaedro ligeramente distorsionado (las razones de la distorsión son desconocidas) con la longitud de enlace de 2.02 a 2.11 Å dependiendo del contraion. El estudio de diferentes estructuras de Mg^{2+} solvatado por disolventes donadores de oxígeno revela que la longitud del enlace Mg-O cambia muy poco de disolvente a disolvente.⁽³⁵⁾ Sin embargo, el coeficiente de actividad al pasar el

ion Mg^{2+} de agua a DMSO indica que la solvatación por DMSO en la mezcla DMSO – agua es preferible.

El número de coordinación del ion Ca^{2+} cambia al pasar de agua, donde es normalmente 8, coordinado como una antiprisma cuadrado, a DMSO donde su número de coordinación se reduce a 6 y se observa una distorsión en la geometría, en vez del octaedro Ca^{2+} presenta una estructura monoclinica. ^(33, 35) La distancia Ca–O promedio para la estructura es 2.356 Å, y la distancia de Ca–S es de 3.613 Å. En este caso, al igual que para Mg^{2+} , los contraiones de perclorato son ligantes muy débiles y se encuentran en la segunda esfera de coordinación.

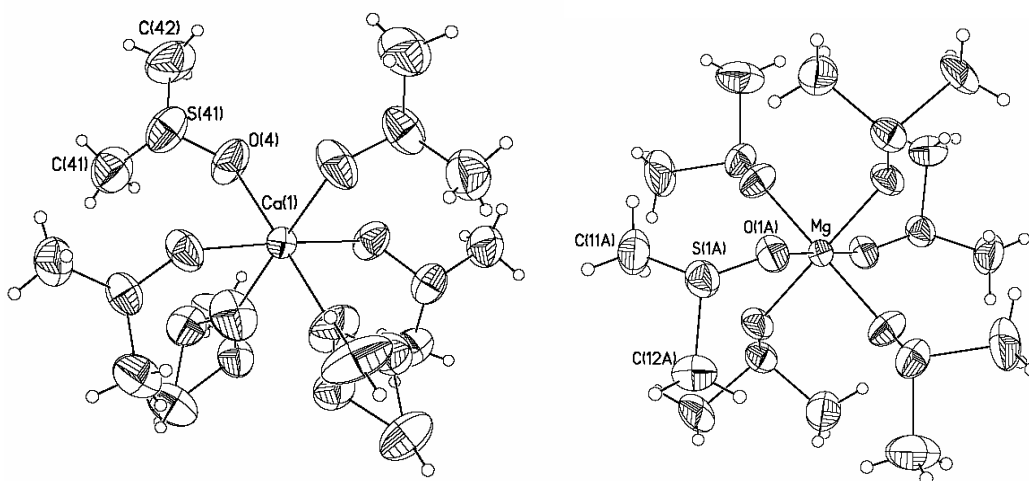


Figura 2.12 Estructuras de rayos X de Ca^{2+} y Mg^{2+} solvatados por DMSO. ⁽³⁵⁾

En agua se conocen por lo menos tres posibles modos de hidratación del Ca^{2+} con números de coordinación 6, 7 y 8, donde las geometrías correspondientes son octaédrica, octaédrica centrada en la cara y cuadrada antiprismática. ⁽³⁷⁾ La geometría aquí está influida por el contraion en cada caso particular, ya que las diferencias energéticas en estas moléculas parecen ser muy insignificantes. La longitud promedio del enlace Ca–O en las moléculas hidratadas es de 2.48 Å. Los ligantes donadores de oxígeno, cuyas moléculas son más grandes que las del agua, sólo pueden formar complejos octaédricos con el metal, debido a que no hay más lugar en la primera esfera de coordinación. El Ca^{2+} es mejor solvatado por las moléculas donadoras como DMSO o DMF, que por el agua.

Pero al mismo tiempo, al cambiar oxígeno por el átomo de nitrógeno, la solvatación del metal disminuye, lo que indica que el Ca^{2+} , al igual que Mg^{2+} prefiere ser solvatado por átomos duros.

El ion Sr^{2+} en los estudios de LAXS demuestra ser octacoordinado en agua, con distancias Sr-O de 2.62 Å, en cambio, en solución de DMSO el metal se vuelve hexacoordinado, con una geometría octaédrica con las distancias Sr-O de 2.54 Å.⁽³⁸⁾ En estado sólido el Sr^{2+} presenta 3 especies con coordinación diferente.⁽³³⁾ Una es probablemente $\text{Sr}(\text{dmsO-O})_6^{2+}$ y las otras dos son dímeros de Sr: $[(\text{dmsO-O})_5\text{-Sr}(\mu\text{-dmsO-O})_2\text{-Sr}(\text{dmsO-O})_5]^{4+}$ y el otro contiene molécula de agua aparte de DMSO a pesar de que el compuesto fue obtenido en presencia de éter etílico con muy baja concentración de agua en la mezcla de reacción, $[(\text{dmsO-O})_5\text{-Sr}(\mu\text{-dmsO-O})_3\text{-Sr}(\text{OH}_2)_2(\text{dmsO-O})_3]_2^{4+}$, presentando de esta manera números de coordinación 6, 7 y 8.⁽³³⁾

Se sabe muy poco sobre la solvatación de los iones en mezclas de DMSO-agua. Esto se debe a su pobre espectroscopia, lo que implicaría métodos muy costosos (resonancia de O^{17}) para llevar a cabo un estudio de la solvatación preferible en las mezclas de disolventes. Se plantea un comportamiento parecido de Ca^{2+} y Sr^{2+} con los iones de lantánidos. La solvatación preferible para Eu^{3+} fue determinada mediante experimentos de fluorescencia en mezclas de agua con diferentes disolventes orgánicos, y en DMSO 90 % v/v, el catión resulta ser más solvatado por DMSO que por agua.⁽⁴⁷⁾

2.4.3 Estructura de hidróxidos

La hidrólisis de metales alcalinotérreos en agua, estudiada por titulaciones potenciométricas, no indica la existencia de productos complejos. Aunque para el ion Mg^{2+} se revela la presencia de compuestos $\text{Mg}_4(\text{OH})_4^{4+}$ a altas concentraciones de metal⁽²⁰⁾ aparte de que se tienen especies mononucleares $\text{Mg}(\text{OH})^+$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, los iones Ca^{2+} y Sr^{2+} presentan sólo mono y di hidroxocomplejos en disolución. Las constantes de formación de hidroxocomplejos están presentadas en la Tabla 2.5. Estos valores dependen mucho de la fuerza iónica.

Tabla 2.5. Hidroxocomplejos y sus constantes de formación para los metales alcalinotérreos en agua (25° C, $I=0$, $L=OH^-$).

Metal	logK (ML/M.L)	logK ($M_4L_4/M^4.L^4$)	logK ($M.L^2/ML_2$)
Mg	2.58	16.3	-11.15 (s)
Ca	1.3		-5.19 (s)
Sr	0.8		

Las estructuras probables de los hidroxocomplejos de estos cationes fueron estudiados en mayor detalle por difracción de rayos X, reacciones de cumulos de metales con agua en fase gas⁽⁴¹⁾ y cálculos teóricos.

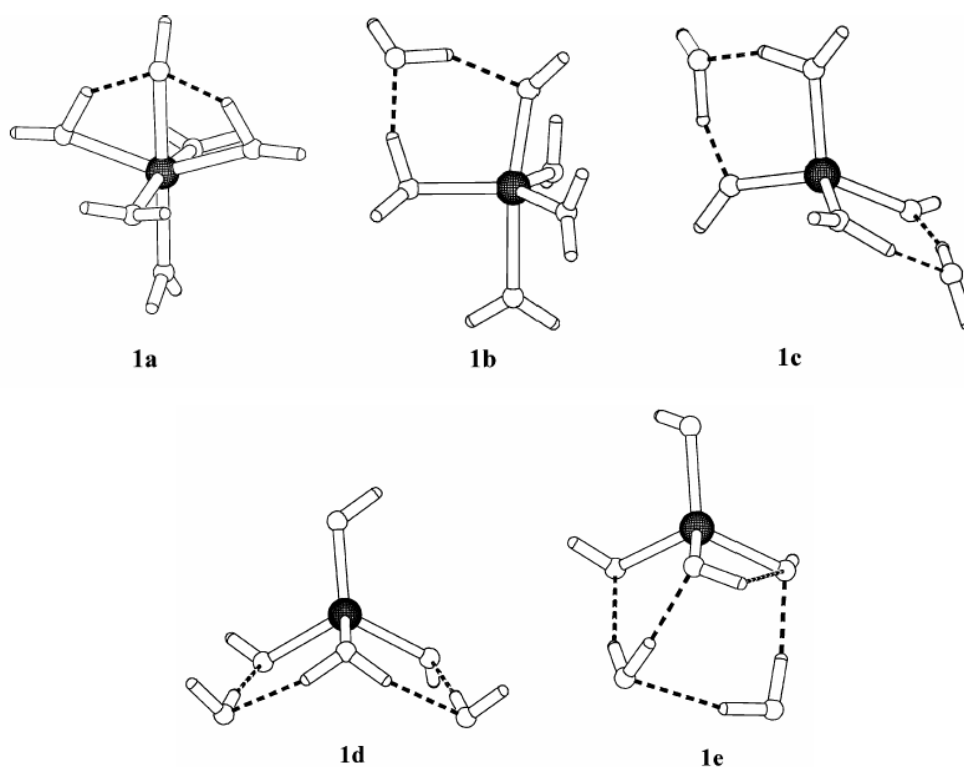


Figura 2.13. Estructuras de Mg^{2+} solvatado por agua sustituida con 1 a 4 hidróxidos.⁽³⁶⁾ La figura representa la estructura convencional hexacoordinada para monohidróxido del magnesio obtenida con la base 6-31+G*. Al ampliar la base hasta aug-ccpVTZ, se descubre que la estructura **1a** es en realidad un estado de transición que lleva a la estructura estable **1b**, la adición sucesiva de hidroxilos y optimización de geometría con base aug-ccpVTZ lleva a las estructuras **1c-1e** con geometría tetraédrica y las aguas desplazadas por hidroxilos.

En uno de los estudios recientes⁽³⁶⁾ se estimó la estructura y el número de coordinación de hidroxocomplejos de Mg^{2+} . El uso de cálculos de funcionales de la densidad con la base ampliada B3LYP/aug-cc-pVTZ ha dado resultados inesperados. Los autores proponen que el hidróxido puede cambiar el número de coordinación del ion metálico (Figura 2.13). Dicho trabajo propone que las moléculas de H_2O que solvatan el metal se intercambian sucesivamente por los hidroxilos. Un hidróxido cambia el número de coordinación de Mg^{2+} a 5 (bipirámide trigonal); dos hidróxidos a 4 (tetraedro); la estructura tetraédrica se conserva hasta que la cantidad de hidróxidos llega a 4, número máximo que puede albergar el catión.

El cambio en la geometría en presencia de iones hidróxido ocurre también cuando en vez de agua, el ion está solvatado por los formiatos o por amoníaco, señalando que el cambio de estructura va a depender sólo de la presencia de OH^- , sin importar otras moléculas presentes en la esfera de coordinación. Este estudio propone un cambio en los mecanismos de las reacciones catalizadas por el ion Mg^{2+} propuestos hasta la fecha, sin embargo, debido a la relativa novedad del trabajo, futuras comprobaciones experimentales son necesarias. Hasta la fecha no existen estudios semejantes para el resto de metales alcalinotérreos.

La formación de cúmulos a partir de metales alcalinotérreos ionizados a monocationes con descargas eléctricas mediante PACIS (*pulse arc cluster ion source*) con agua en fase gas probablemente no corresponde con precisión a las estructuras de complejos en agua, sin embargo, estas geometrías podrían existir en disolventes con constante dieléctrica más baja, donde la interacción entre especies cargadas es más fuerte. Los estudios recientes⁽⁴¹⁾ informan la aparición de especies de tipo $M_n(OH)_{2n-1}^+$ que son los conglomerados de la especie cargada MOH^+ con (n-1) moléculas neutras $M(OH)_2$. Las distribuciones de partículas en este tipo de experimentos señalan $n = 1$ a 5 para los iones Ca^{2+} y Sr^{2+} con el máximo en $n = 3$ para Ca^{2+} ($Ca_3(OH)_5^+$) y máximo de concentraciones ubicado entre $n = 3$ y $n = 4$ para el Sr^{2+} (Figura 2.14).

Los cálculos teóricos realizados por los mismos autores para el ion Ca^{2+} , sugieren cambio de estabilidad para los clusters de hidróxidos de ion metálico de la manera

siguiente: $\text{Ca}_3(\text{OH})_5^+ > \text{Ca}_2(\text{OH})_3^+ > \text{CaOH}^+$, sugiriendo una especie cíclica estable cuando $n = 3$.

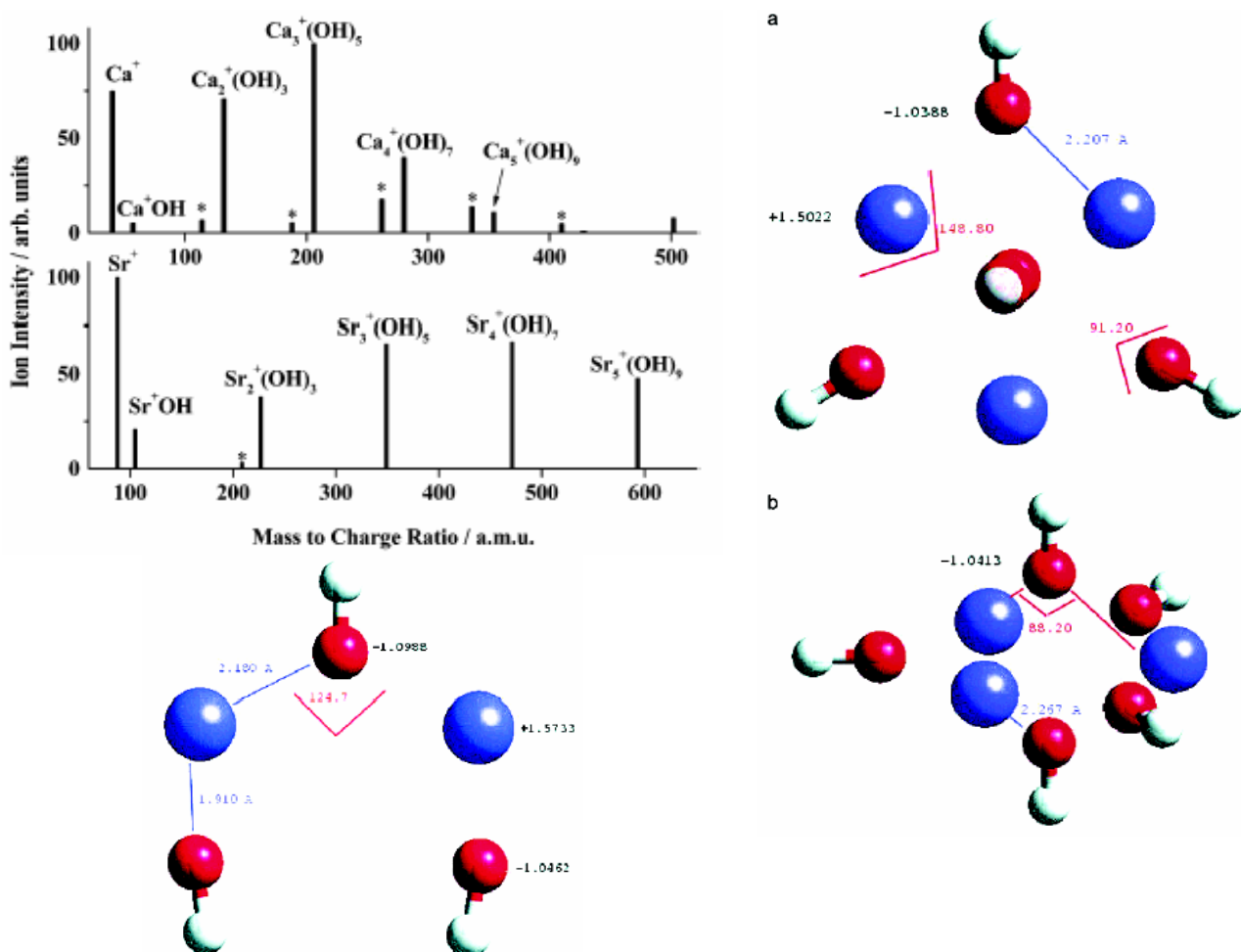


Figura 2.14. Distribución de especies para cúmulos de Ca_n^+ y Sr_n^+ , formados por PACIS, que reaccionan con vapor de agua, formando hidróxidos polinucleares y estructuras calculadas con el método DFT de $\text{Ca}_n(\text{OH})_m^+$ para $n=2$ y $m=3$ y $n=3$ y $m=5$, respectivamente. ⁽⁴¹⁾

No existen simulaciones teóricas de complejos de Sr^{2+} , debido a la presencia de efectos relativistas para este ion metálico. Sin embargo, la geometría de su hidroxocomplejo fue encontrada de manera experimental mediante estudios de difracción de rayos X.

La estructura de dihidróxido de Sr^{2+} fue resuelta por difracción de rayos X a 20 K en los años 50.⁽⁴²⁾ La estructura propone 8 moléculas de agua coordinadas con Sr^{2+} , con una geometría de antiprisma cuadrado, mientras que los iones hidróxido se unen por arriba y por abajo a lo largo del eje C_4 . Se ha calculado la estabilidad del enlace Sr-OH en mono y dihidroxo complejos, teniendo valores de 450 kJ/mol y 104 kJ/mol respectivamente.

Hasta la fecha el estudio detallado de la hidrólisis de iones de metales alcalinotérreos en mezclas DMSO – agua, 80 % DMSO v/v, sólo se ha llevado a cabo para el ion Be^{2+} .⁽³²⁾ Se ha revelado la formación de monómeros de berilio, unidos a 1 hasta 3 hidróxidos. Las estructuras son más simples que en agua, debido probablemente a la gran acidez del catión, que provoca su mayor solvatación por DMSO, y pérdida de la complejidad de la estructura por falta de sitios de coordinación. Sin embargo, el Be^{2+} es muy distinto al resto del grupo, por lo cual este comportamiento no puede ser generalizado. Es probable que las estructuras de los hidroxocomplejos en DMSO sean parecidas a las de agua, debido a que ambos disolventes poseen constante dieléctrica relativamente alta y alto grado de estructura interna. Sin embargo, tales factores como desestabilización del hidróxido al cambiar del medio y estabilización de los cationes metálicos, tamaño del disolvente y, aunque pequeño, cambio de solvatación pueden influir sobre las geometrías precisas de los complejos.

2.5. Cálculos teóricos

Debido al papel importante de Mg^{2+} y Ca^{2+} en los sistemas vivos se han realizado algunos cálculos teóricos para explicar el modo por el cual estos cationes pueden unirse a los diésteres fosfato.⁽⁴³⁾ Se conocen varias simulaciones de centros activos de enzimas hidrolíticas^(55, 11) y además se ha hecho un extenso trabajo sobre el estudio de la hidrólisis de monoésteres fosfato.⁽⁴⁵⁾

Existen pocos resultados con diéster fosfato, probablemente debido a que el estado de transición para la reacción de su hidrólisis todavía se está discutiendo.^(4,7,8) Llama la atención una de las últimas investigaciones, donde se llevaron a cabo cálculos

teóricos para entender la estructura de metales Mg^{2+} y Ca^{2+} con dimetil fosfato, como el ejemplo más simple de un diéster fosfato.⁽⁴³⁾ Los cálculos fueron realizados utilizando teoría de Funcionales de Densidad a nivel de B3LYP/6-31G(*d,p*), además del uso del modelo COSMO para simular el disolvente (medio polar continuo). Los resultados indican que el ion Mg^{2+} tiende a unirse de manera indirecta al sustrato (mediante un puente con una molécula de agua), mientras que el Ca^{2+} se une directamente al oxígeno cargado negativamente del grupo fosfato. Sin embargo, los parámetros espectroscópicos obtenidos mediante estos cálculos no correlacionan bien con los resultados experimentales, lo que indica que el disolvente puede tener un enorme papel en el modo de coordinación de estos metales y tiene que ser utilizado con mas detalle en cálculos teóricos de este tipo.

Capítulo 3.

Objetivos del trabajo

El sistema que emplea iones de metales alcalinotérreos en DMSO-agua tiene una de las actividades catalíticas más altas de las conocidas para la hidrólisis del diéster fosfato BNPP en presencia de iones metálicos en general y sobrepasa por al menos 4 órdenes de magnitud la actividad fosfodiesterolítica informada hasta la fecha para metales alcalinotérreos. ⁽²⁹⁾ Puede considerarse como el modelo más simple de una enzima hidrolítica, donde el hidróxido del metal está rodeado de un medio polar con baja concentración de agua. Sin embargo, los estudios previamente realizados no son suficientemente detallados para proponer un mecanismo de reacción, así como el hecho de identificar las especies activas y proporcionar una hipótesis que explique el efecto tan fuerte del disolvente sobre la actividad catalítica.

Objetivo general:

Realizar un estudio detallado de la formación y actividad fosfoesterolítica de hidroxocomplejos de metales alcalinotérreos en el medio DMSO-agua.

Objetivos particulares:

- Determinar la composición y estabilidad de las especies formadas en el medio de la reacción con diversas técnicas experimentales.
- Estudiar los efectos de otros disolventes con parámetros semejantes, la fuerza iónica y soluciones amortiguadoras.
- Realizar estudios cinéticos, tanto en la mezcla DMSO-agua, como en agua pura, en un amplio intervalo de las concentraciones de componentes utilizando como sustratos ésteres fosfato de diferentes estructuras y con diferentes mecanismos de reacción, para determinar con ello la selectividad de la catálisis y proponer así un mecanismo para la reacción.

Capítulo 4.

Parte experimental

En el presente trabajo se ha estudiado la hidrólisis de 3 sustratos diferentes en presencia de metales alcalinotérreos Mg^{2+} , Ca^{2+} y Sr^{2+} (Be^{2+} no fue seleccionado debido a que su química es muy diferente a la del resto del grupo, y Ba^{2+} presentó problemas de solubilidad a altas concentraciones de DMSO). La hidrólisis se llevó a cabo en agua y en mezclas de DMSO – agua con porcentajes de DMSO de 5 a 98 % v/v, utilizando principalmente la concentración de 90% DMSO v/v, a lo que posteriormente nos vamos a referir como DMSO 90 %. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 37 °C, la temperatura correspondiente a la del cuerpo humano y por lo tanto adecuada para el estudio de sistemas con posibles bioaplicaciones.

El trabajo experimental está dividido en varias partes. La primera consiste en la caracterización de los hidroxocomplejos y la interacción de los cationes con el sustrato BNPP en agua y DMSO 90 %. Esta caracterización fue llevada a cabo mediante titulaciones potenciométricas, titulaciones conductimétricas y RMN. La segunda parte consiste en el estudio cinético, el cual implica el seguimiento de la reacción de hidrólisis de sustratos en diferentes condiciones de reacción mediante espectroscopía UV-vis, empleando la técnica de stoped-flow cuando fue necesario. En la tercera parte se modificaron las condiciones y parámetros de reacción relevantes para la aclaración del mecanismo. En la cuarta parte del trabajo experimental se lleva al desarrollo de un sistema reproducible y fácil de usar, a pH fijo, gracias al uso de disoluciones amortiguadoras. Finalmente, se propone un mecanismo de reacción.

4.1. Equipo

Las mediciones UV – vis fueron realizadas en equipos HP 8453 Agilent y UNICAM UV 500. Las mediciones stopped - flow fueron llevadas a cabo en el equipo Applied Photophysics. En todos los casos se han utilizado las celdas de cuarzo con la longitud de paso de 1 cm. Las mediciones potenciométricas fueron llevadas a cabo con el

electrodo de vidrio CORNING SemiMicro Combo 476156 en el pH-metro ORION 420A bajo el flujo de nitrógeno constante. Las mediciones conductimétricas fueron llevadas a cabo en la celda de conductimetría de vidrio YSL, con la constante de celda 1.0 M. Se ha utilizado el equipo de resonancia JEOL GX 300 para la titulación por ^{31}P (121.6565 MHz) y caracterización de sustratos por ^1H (300.5311 MHz). Todos los experimentos fueron llevados a cabo en agua nanopura purificada con el equipo NANOPURE BARNSTEAD. La temperatura fue mantenida constante gracias a los baños de agua Fischer Scientific ISOTEMP 1006S. La temperatura de las reacciones fue medida en cada caso con el termómetro digital QUARTZ *digi-termo*.

4.2 Reactivos

Sales: $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, PM 331.33 g/mol y 99 % pureza; $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, PM 394 g/mol, 99.9 % pureza, son de AlfaAesar. Sales $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, PM 311.04 g/mol, 99 % pureza; NaClO_4 , PM 122.44 g/mol 99 % pureza; biftalato de potasio, PM 204.23, pureza ACS 99.95-100.05 %; ácido HClO_4 40%; **substrato** BNPP, PM 340 g/mol, pureza 99%, **buffers** bis-TRIS PM 209.24 g/mol, 98+%, Clorurhidrato de guanidina, 99 %, 1,5-diaminopentano PM 102.18 son de Aldrich, TRIS PM 121.1 g/mol 99 %; Bis – TRIS Propano PM 282.3, > 99% son de SIGMA; **bases** NaOH, solido, PM 40 g/mol, 98.8%; Bu_4NOH , disolución 40 % en agua, PM 259.5 g/mol; disolventes DMSO, 100.0% (ensayo) agua < 0.03 % y DMF , 99.9% (ensayo) son de JT Baker.

Las disoluciones *stock* de las sales 0.1 M se prepararon en DMSO 90 %. Las disoluciones para las cinéticas se preparaban cada 2 semanas. Para las titulaciones siempre se utilizaban disoluciones recién preparadas. La base para las titulaciones se utilizaba en disoluciones *stock* de 0.1 M en DMSO 90% y para mediciones cinéticas se utilizaba directamente (disolución en agua 1.83 M).

La cantidad de agua en DMSO seco fue determinada con la prueba de Karl – Fischer. Para el trabajo experimental se preparaba la disolución *stock* de DMSO 90 % - que se utilizaba el mismo día.

Se han estudiado tres sustratos diferentes, un triéster y dos diésteres fosfato; bis-*p*-nitrofenilfosfato (BNPP) y 2-hidroxiopropil-*p*-nitrofenil fosfato (HpNPP). El triéster fosfato utilizado fue *p*-nitrofenil difenil fosfato (PNPDPP) (Figura 2.4 y Tabla 2.1). Todas las cinéticas fueron seguidas por el desprendimiento de nitrofenolato.

BNPP fue utilizado después de su purificación por recristalización en medio ácido. HpNPP (sal de Bario) y NPDPP fueron sintetizados en el laboratorio. Los sustratos fueron preparados como disoluciones *stock* de 5 mM en DMSO 90 % para BNPP y NPDPP y en agua para PNP, ya que este compuesto se hidroliza en DMSO. Para experimentos en DMSO con HpNPP era necesario pasar la disolución del sustrato en un pequeño volumen de agua por la resina IR – 120 (H^+) para remover Ba^{2+} y después llevar al aforo la solución obtenida. Las disoluciones se guardaban en el refrigerador y se ocupaban durante un mes. HpNPP y NPDPP fueron obtenidos a partir de rutas de síntesis descritas en la literatura.^(39,40) HpNPP es un polvo blanco, con peso molecular de 277 g/mol, es soluble en agua. NPDPP también es un polvo blanco, con un peso molecular de 372 g/mol, insoluble en agua.

4.3. Síntesis

Bu_4NClO_4 Se mezclan cantidades equivalentes de Bu_4NOH y $HClO_4$ en agua. El precipitado se filtra y se lava con pequeñas cantidades de agua hasta pH neutro. Se deja secar.

2-hidroxiopropil-*p*-nitrofenil fosfato⁽³⁹⁾ La disolución de la sal disódica de *p*-nitrofenilfosfato (1.32g, 5 mL) en agua (10 mL) fue pasada por la columna con la resina IR – 120 (H^+), y el eluyente ácido fue llevado a pH 8 con una disolución de amoníaco. Se añadieron 20 mL de 1,2-epoxipropano y la disolución fue mantenida a 35 °C por 40 horas. El epóxido sin reaccionar fue removido por destilación a presión reducida. La mezcla de reacción pasó por la columna IR – 120 (H^+). La disolución fue neutralizada a pH debajo de 7 con una disolución de hidróxido de Bario libre de carbonatos. Después de

esto la disolución fue concentrada a un volumen cerca de 10 mL a presión reducida y temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 2 volúmenes de etanol y el precipitado de *p*-nitrofenilfosfato sin reaccionar se remueve por filtración. El filtrado se concentró a un volumen pequeño y fue añadida bajo rigurosa agitación una mezcla de 10 % de etanol en 300 mL de acetona. Se filtra el precipitado blanco obtenido. El rendimiento final fue del 40 %.

Difenil – 4 nitrofenil fosfato⁽⁴⁰⁾. Se pusieron a reaccionar cantidades equimolares de nitrofenolato (2 g) y difenilfosfoclorhidrato (2.97 mL) en un exceso de 10 % de trietilamina (2.21 mL). El cloruro de trietilamina formado se remueve por filtración. El filtrado se extrae varias veces con agua destilada y se evapora para dar fosfato. El producto crudo con 80% de rendimiento se recristaliza 2 veces de etanol. El rendimiento final fue de 37 %. Los cristales blancos obtenidos funden a 49-51 °C.

Los sustratos fueron caracterizados por RMN, donde sus espectros coincidieron con los informados en la literatura (ver Anexo 1). La pureza de los sustratos fue estimada por el rendimiento de *p*-nitrofenolato después de la hidrólisis completa de los sustratos, que resultó estar superior al 95%.

4.4 Cálculos

Los ajustes de datos experimentales a los modelos teóricos correspondientes fueron llevados a cabo mediante el programa Origin, versiones de 5.0 a 7.0. Las constantes de formación de hidroxocomplejos se determinaron a partir de titulaciones potenciométricas y fueron calculadas con el programa Hyperquad2000. Las curvas de distribuciones de especies fueron calculadas con el programa HySS.

Los modelos teóricos fueron propuestos utilizando el programa Hyperchem 7.5

4.5. Mediciones cinéticas.

Las mediciones cinéticas se llevaron a cabo en celdas de cuarzo con 1 cm de longitud de paso, diseñadas para experimentos UV-vis. A un volumen calculado de disolvente se agregaban con pipetas automáticas *Erlenmeyer* alícuotas de disoluciones stock necesarias para obtener concentraciones deseadas del metal e hidróxido en 3 mL de disolución. La solución se agitaba, se sellaba con la película *Parafilm* y se dejaba en el termostato hasta alcanzar 37°C. Al iniciar la reacción se adicionaba un pequeño volumen de sustrato, se volvía a sellar con película *Parafilm*, se agitaba y la reacción procedía en celdas termostatadas del equipo UV-vis.

Las mediciones de las constantes de rapidez de hidrólisis fueron llevadas a cabo mediante el monitoreo de la aparición del *p*-nitrofenolato, el producto de hidrólisis de los tres sustratos por espectroscopía UV-vis. El nitrofenolato tiene un color amarillo con el máximo de absorción en 400 nm en agua ($\epsilon = 18\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 425 nm en DMSO 90 % ($\epsilon = 31\,170\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A continuación se presentan los máximos de absorción y las absorciones molares a diferentes concentraciones de DMSO. Estos valores fueron encontrados mediante curvas de calibración con *p*-nitrofenolato puro a 5-7 concentraciones diferentes en cada concentración de DMSO dada.

Tabla 4.1. Cambio del máximo de absorción y absorción molar de *p*-nitrofenolato a diferentes concentraciones de DMSO.

% DMSO v/v	Máximo de absorción, nm	Absorbancia molar, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
0	400	18300
20	407	22000
40	411	24045
60	415	27000
70	417	28397
80	420	29119
90	425	31167

La hidrólisis de HpNPP y NPDPP lleva a la salida de un equivalente de *p*-nitrofenolato. Las constantes de velocidad de hidrólisis básica de BNPP y HpNPP a bajas concentraciones de OH^- en agua fueron calculadas mediante el ajuste lineal a la velocidad inicial de la reacción utilizando la siguiente expresión:

$$A = k_{obs} \times [sustrato] \times \varepsilon_{NP} \times t \quad (4.1)$$

donde A es la absorbancia observada, t es el tiempo, k_{obs} la constante de velocidad observada y ε_{NP} es la absorbancia molar del *p*-nitrofenolato.

En los casos cuando la reacción fue bastante rápida (presentando tiempos de vida media menores de 1h) la constante catalítica fue calculada mediante ajuste a la ecuación de velocidad integral de primer orden:

$$A = \Delta A_{inf} (1 - e^{-kt}) + A_o \quad (4.2)$$

Donde A_o es la absorbancia al inicio de la reacción y ΔA_{inf} es la diferencia entre la absorbancia a tiempo infinito y la absorbancia inicial.

La hidrólisis de BNPP lleva a la salida de 1 o 2 equivalentes de *p*-nitrofenolato. En el primer caso las constantes se calcularon mediante el ajuste a la ecuación 4.2. Para el segundo caso se utilizó el ajuste a la ecuación de primer orden con salida de dos productos por dos procesos consecutivos.

$$A = A_{inf} \left(2 + \frac{k_1 e^{-k_2 t} + (k_1 - 2k_2) e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1} \right) \quad (4.3)$$

Donde k_1 es la constante de rapidez observada de la hidrólisis del primer nitrofenolato, k_2 la del segundo y A_{inf} es la absorbancia final correspondiente a la salida de un nitrofenolato.

El desarrollo de las dos primeras ecuaciones puede ser encontrado en cualquier libro de cinética química.⁽⁵²⁾ El desarrollo de la última ecuación se presenta en la referencia.⁽²⁸⁾

4.6 .Estabilidad de las disoluciones

Se descubrió que al dejar las soluciones por más de una hora al aire, estas pierden su actividad, (Figura 4.4). Esto se debe a la formación de carbonatos solubles que inhiben la reacción, sobre todo a bajas concentraciones de la base. La disminución de la actividad puede evitarse si la reacción se lleva a cabo bajo N_2 , además de utilizar siempre disoluciones de la base recién preparadas.

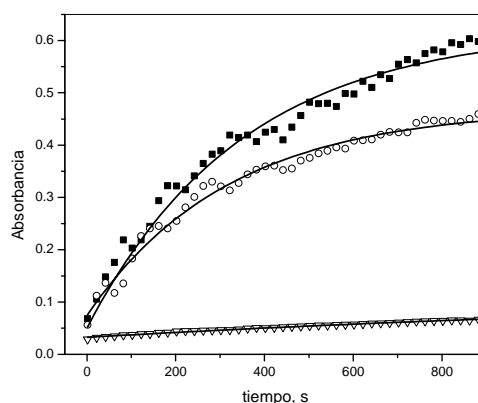


Figura 4.4. Efecto del tiempo de incubación de la disolución básica de Mg^{2+} sobre la velocidad observada para la hidrólisis de BNPP. Curvas cinéticas para la hidrólisis de 0.02 mM de BNPP en presencia de 2 mM de Mg^{2+} y 2 mM de Bu_4NOH bajo nitrógeno a diferentes tiempos de incubación (cuadrados sólidos), inmediatamente después de mezclar los componentes (círculos abiertos), después de 60 minutos bajo nitrógeno (triángulos abiertos) después de 30 minutos de dejar la disolución al contacto con el aire.

Las constantes cinéticas se obtuvieron como un promedio de las mediciones por triplicado, cuando la discrepancia entre los valores era menor de 10 %.

4.7. Titulaciones potenciométricas

Todas las titulaciones potenciométricas fueron llevadas a cabo a 37 °C, en un volumen de 30 mL bajo agitación constante y en presencia de nitrógeno. El electrodo se calibraba con 3 disoluciones amortiguadoras comerciales de pH 4, 7, y 10, disueltas en agua. Para determinar la constante de autoionización de agua en DMSO 90 % y calibrar la escala del pH-metro en términos de concentración de protones, y no como su actividad, fueron realizadas titulaciones potenciométricas de $HClO_4$ 1 mM en DMSO 90 % v/v en presencia de Bu_4NClO_4 10 mM como un electrolito soporte. La constante de

autoionización del agua fue calculada como el valor promedio de 3 titulaciones. Para esto se utilizó el ajuste de la curva de titulación a la ecuación de neutralización de un ácido fuerte con una base fuerte.⁽⁵³⁾

$$V = (V_e C_B + V_0 K_w / [H^+] - V_0 [H^+] f) / (C_B + [H^+] f - K_w / [H^+]) \quad (4.4)$$

donde V es el volumen de la base añadida, V_0 es el volumen inicial de la disolución, C_B es la concentración de la base con la cual se llevó a cabo la titulación y K_w es la constante de autoionización de agua y f es el factor de corrección.

De aquí se obtuvo el valor de $pK_w = 21.7 \pm 0.3$ y $\log f = 0.6$. El valor obtenido de pK_w es cercano al informado en literatura $pK_w = 21.3$ a 30°C en 90% DMSO.⁽⁵⁴⁾ y 22.25 en DMSO puro.⁽⁵⁵⁾

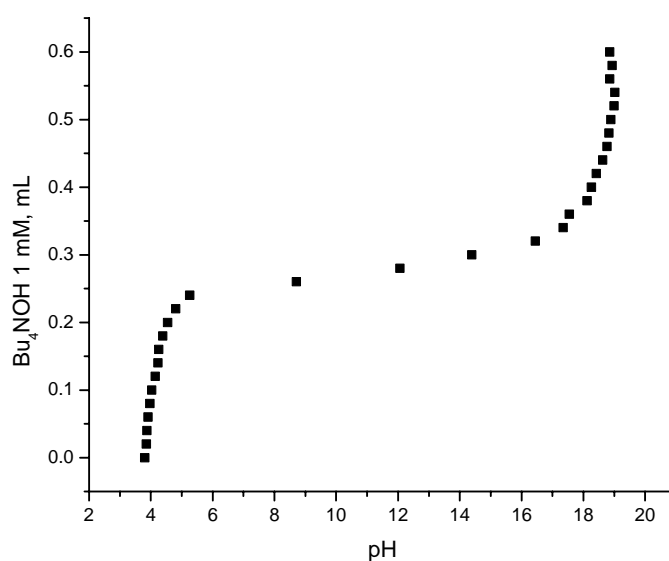


Figura 4.5 Curva de titulación del ácido perclórico 1 mM en DMSO 90 % a 37°C .

Las titulaciones de las sales metálicas fueron llevadas a cabo en presencia de Bu_4NClO_4 10 mM como un electrolito soporte y añadiendo HClO_4 1 mM al inicio de cada titulación para comprobar en cada caso el valor del factor de corrección $\log f$. Para cada metal fueron hechas 3 titulaciones con concentraciones 0.5 mM, 1mM y 2 mM de la sal metálica respectivamente. Las constantes de formación de especies fueron calculadas

como el valor promedio de las tres titulaciones. Una titulación típica se hizo con adición de pequeñas cantidades (10-30 μL) de Bu_4NOH previamente valorado, registrando los valores de pH obtenidos, teniendo cuidado de que estos valores fueran estables. Cada muestra se desgasificó y se mantuvo bajo atmósfera de N_2 durante toda la titulación. Tenía importancia que la disolución a titular esté libre de carbonatos y que no haya absorción de CO_2 durante la titulación para obtener curvas reproducibles. Las curvas de pH vs. volumen de Bu_4NOH adicionado fueron corregidas por el factor f determinado para cada una de ellas, con el objeto de tener los valores de $-\log [\text{H}^+]$ vs. volumen de Bu_4NOH adicionado.

4.8 Titulaciones conductimétricas ⁽⁵⁶⁾

Las titulaciones conductimétricas fueron llevadas a cabo en un volumen de 30 mL, bajo N_2 con agitación constante. La conductancia electrolítica G (medida en S) define a la conductividad de la disolución χ (en S cm^{-1}) como

$$G = \chi \times k \quad (4.5)$$

Donde k es la constante de la celda conductimétrica (en cm). El valor de la constante de celda k es igual a 1.0 cm (calibrada con KCl). Para el caso de un conductor iónico el valor de conductividad dependerá del número de iones presentes. Para normalizar la conductancia respecto a las cantidades de iones presentes se introduce una nueva magnitud, la conductancia molar Λ_m (en $\text{S cm}^2\text{mol}^{-1}$), que se define como:

$$\Lambda_m = 1000 \frac{\chi}{c} \quad (4.6)$$

donde c es la concentración de electrolito disuelto (en mol L^{-1}) y 1000 es el factor de conversión de L a cm^3 .

Sin embargo, la conductividad molar de un electrolito no depende de manera lineal de la concentración del mismo. Para electrolitos verdaderos este cambio puede ser estimado mediante la Ley de Kohlrausch.

$$\Lambda_m = \Lambda_m^0 - A\sqrt{c} \quad (4.7)$$

Donde Λ_m^0 es la conductancia molar y A es un coeficiente que depende de la naturaleza del electrolito, del disolvente y de la temperatura.

Antes de llevar a cabo las titulaciones se han calculado las conductividades molares a dilución infinita Λ_m^0 para cada sal utilizada.

Utilizando las titulaciones conductimétricas fue posible predecir la estequiometría de la reacción en el mínimo de la curva y describir el comportamiento general de las sales en DMSO 90 %.

Capítulo 5.

Determinación de las especies activas

Un estudio completo del mecanismo de catálisis implica conocer a las especies responsables de la actividad catalítica. En el presente trabajo se utilizaron diversos métodos de caracterización del sistema: titulaciones potenciométricas, conductimétricas y de resonancia magnética nuclear. La espectroscopía de metales alcalinotérreos es muy pobre. Esto limita el uso de técnicas sensibles como fluorescencia. Por lo tanto, en nuestro conocimiento todavía existen muchas fallas, por ejemplo, no se conoce con precisión la solvatación preferencial de los metales. Para este caso utilizamos los resultados obtenidos para solvatación preferencial de Eu^{3+} informados en la literatura⁽⁴⁷⁾ y asignamos el mismo grado de solvatación para metales alcalinotérreos (muchos estudios sugieren que la química de metales alcalinotérreos pesados, por ejemplo, Ca^{2+} y Sr^{2+} es muy parecida a la de los lantánidos). Por lo que se supone que en DMSO 90 % los iones metálicos están solvatados de una manera preferencial por DMSO.

Todas las técnicas utilizadas aportaban información incompleta sobre los compuestos. Sólo la unión de todos los resultados nos permitió caracterizar los sistemas con suficiente precisión para llevar a cabo cálculos de constantes cinéticas y otros parámetros de reacción para las especies individuales.

5.1 Titulaciones potenciométricas

El enfoque principal fue hecho a las titulaciones potenciométricas, sin embargo los resultados en muchos casos fueron difíciles de interpretar. Los equilibrios en DMSO 90% resultaron complicados con respecto a los presentados en agua, incluyendo formación de varias especies diméricas y monoméricas, con estequiometría diferente a la del agua.

Una de los problemas principales fue la baja reproducibilidad de algunos datos. Las titulaciones potenciométricas se llevaron a cabo en el intervalo de pH de 3 a 20. A pH mayor de 15 la concentración de H^+ libre es muy baja, lo que dificulta

considerablemente la medición de pH, provocándose una discrepancia en los resultados. Los errores en mediciones de pH afectan seriamente la estimación de constantes de formación, sobre todo en los casos de las especies polinucleares con muchos hidróxidos coordinados. Los valores de las constantes de formación para especies existentes a menores valores de pH tienen mucha mayor precisión que aquellos que aparecen a valores de pH altos. El ion Mg^{2+} que es el más ácido de todos, presenta la menor dispersión en los valores de las constantes medidas comparadas con los iones Ca^{2+} y Sr^{2+} , este último presenta formación de hidroxocomplejos en el intervalo de pH 16 – 19, lo que involucra error en los valores de las constantes informadas. Los ajustes realizados se presentan en el Anexo 2 del presente trabajo.

5.1.1. Mg^{2+}

Las titulaciones de Mg^{2+} dan la menor dispersión de datos. Los valores de las constantes de formación sucesivas de $MgOH^+$ y $Mg(OH)_2$ son muy cercanos, por lo que la mayor parte de $MgOH^+$ dismuta para generar la especie neutra y así el monohidroxocomplejo, el cual normalmente se encuentra en muy bajas concentraciones y nunca predomina en los equilibrios. A concentraciones elevadas de Mg^{2+} el ajuste realizado por el programa HYPERQUAD tiende a rechazar la especie $MgOH^+$. En otros casos, la especie permanece en el ajuste, pero los parámetros generales de ajuste empeoran considerablemente. Sin embargo, como se observa posteriormente en los datos cinéticos, su presencia es indispensable para justificar los resultados obtenidos.

A diferencia de especies normalmente encontradas en agua, aquí se observan especies con mayor número de OH^- , tales como $Mg(OH)_3^-$ y $Mg_2(OH)_5^-$. Probablemente esto se debe a la fuerte desestabilización del hidróxido, que tiende a unirse a partículas neutras de mayor tamaño para así dispersar su carga y disminuir el efecto desestabilizador del disolvente.

La calidad de ajuste no cambia si las especies monoméricas presentes se cambian por partículas di- o hasta triméricas, tipo $Mg_2OH_2^{2+}$, etc. Por lo cual, las especies encontradas representan sólo las fórmulas mínimas correspondientes. La composición

real de las especies es difícil de caracterizar. Uno de los métodos adecuados sería la medición de las propiedades coligativas de la disolución. Sin embargo se trabajó a concentraciones demasiado bajas de los iones metálicos para poder hacer uso de estas técnicas.

Los valores promedios de las constantes de equilibrio obtenidas de los ajustes de los datos de la titulación a tres concentraciones del metal diferentes, se presentan a continuación. En cada caso la constante de autoionización del agua se dejó como parámetro ajustable, ya que su determinación independiente fue bastante inexacta (un error ± 0.3 en escala logarítmica) y en el caso contrario, el ajuste requería de especies con estequiometría metal/hidróxido más alta, cuya existencia es dudosa. Las constantes de autoionización obtenidas entraban dentro del intervalo de error del valor medido a partir de las titulaciones de HClO_4 .

Tabla 5. 1 Resultados de las titulaciones potenciométricas de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ calculados con el programa Hyperquad2000 de las curvas potenciométricas obtenidas a 3 concentraciones diferentes del metal en presencia HClO_4 de 1 mM titulado con Bu_4NOH

Constante	Mg^{2+} 0.5 mM.	Mg^{2+} 1 mM	Mg^{2+} 2 mM	promedio
K_w	-22	-21.93	-22.25	-22.06
K_{MgOH}	-11.38	-11.54		-11.46
K_{MgOH_2}	-22.61	-22.5	-22.5	-22.51
$K_{\text{Mg}_2\text{OH}_5}$			-59.18	-59.16
K_{MgOH_3}	-40.19	-40.53	-40.53	-40.62

Hay que mencionar, que los ajustes a 2 mM de Mg^{2+} aceptan la especie MgOH^+ , sin embargo, su concentración es irrelevante. Lo mismo ocurre con la concentración de $\text{Mg}_2(\text{OH})_5^-$ a bajas concentraciones de Mg^{2+} . Por lo cual, en la distribución de especies final, ambos valores se han tomado en consideración. Estos valores tienen que ser vistos como fórmulas mínimas. A partir de los valores promedios de las constantes construimos el siguiente diagrama de distribución de especies (Figura 5.1).

Las concentraciones de las especies presentadas, poseen sus máximos en el intervalo de pH 10-18. Este intervalo de pH se parece poco al observado en agua. Sin

embargo, debido al cambio en la constante de autoionización acuosa, la concentración de hidróxido libre en este caso es muy baja. La hidrólisis básica del sustrato no interfiere en este caso, ya que para esta mezcla la disolución neutra posee un pH de 11. Por lo que se logra observar un efecto importante; obteniendo concentraciones altas de especies activas donde casi no estén presentes el metal o el hidróxido libre, los cuales pueden interferir con la reacción.

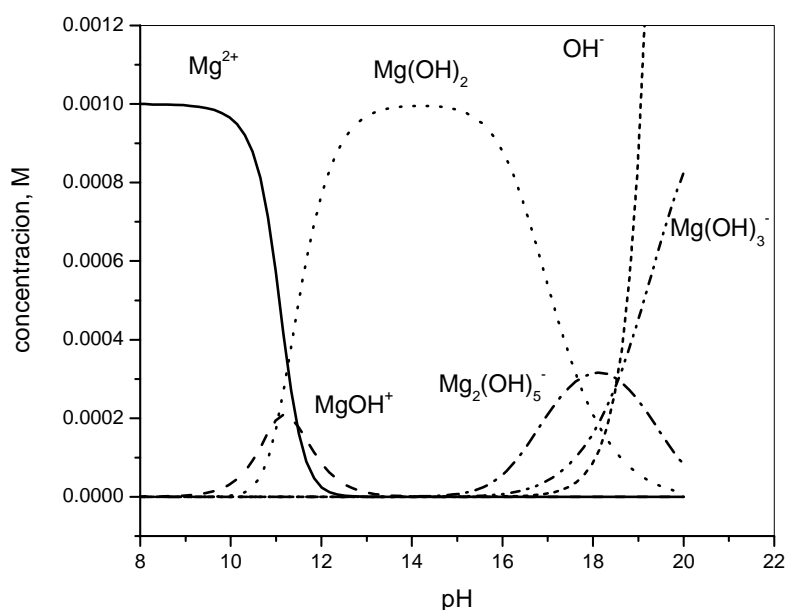


Figura 5.1 Distribución de hidroxocomplejos de Mg^{2+} como función de pH calculada para 1 mM del metal.

5.1.2. Ca^{2+}

Se llevaron a cabo las titulaciones potenciométricas del ion Ca^{2+} con Bu_4NOH en presencia de $HClO_4$ 1 mM, utilizando $Ca(ClO_4)_2$ 0.5, 1 y 2 mM. Los datos de los experimentos y los ajustes realizados en el programa Hyperquad2000 están presentados en el Apéndice 2 y la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Resultados de titulaciones potenciométricas de $Ca(ClO_4)_2$ calculados con el programa Hyperquad2000 de las curvas potenciométricas obtenidas a 3 concentraciones diferentes del metal en presencia de $HClO_4$ 1 mM titulado con Bu_4NOH

constante	Ca ²⁺ 0.5 mM.	Ca ²⁺ 1 mM	Ca ²⁺ 2 mM	promedio
K _w	-22.01	-21.93	-21.82	-21.875
K _{Ca2OH}	-9.24	-8	-7.8	-7.74
K _{CaOH}	-12.85	-11.7	-11.71	-11.705
K _{CaOH2}	-27.34	-26.08	-26.1	-26.09
K _{Ca2OH5}	-70.73	-67.83	-67.5	-67.665

Los valores utilizados para construir los diagramas de distribución de especies y llevar a cabo los cálculos cinéticos fueron el promedio de las titulaciones de Ca²⁺ 1 mM y Ca²⁺ 2 mM. Dada la discrepancia de los valores calculados a 0.5 mM de Ca²⁺ estos no fueron tomados en cuenta al calcular el promedio. La distribución de especies a diferentes pH, (Figura 5.2), fue calculada con *Hyss*, utilizando los valores promedios.

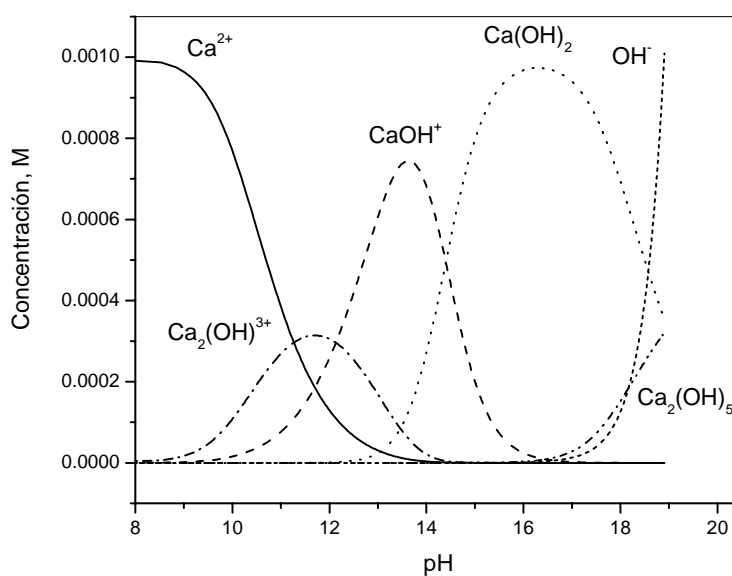


Figura 5.2 Distribución de hidroxocomplejos de Ca²⁺ como función de pH calculada para 1 mM del metal.

Se observa una especie dinuclear nueva Ca₂OH³⁺ a bajas concentraciones de hidróxido, que no se ha registrado en el caso de Mg²⁺. No se conoce con certeza el mecanismo de formación de este complejo. En este caso el OH⁻ funciona como puente entre dos cationes metálicos. Esto se debe a que el Ca²⁺ posee una carga más dispersa que el Mg²⁺, lo que hace que su interacción con el hidróxido sea más débil. En este caso, el

hidróxido unido al metal no pierde por completo su nucleofilia y puede interactuar con otro ion metálico formando un puente. Por otra parte la mayor polarizabilidad del ion Ca^{2+} , si se compara con el Mg^{2+} , sugiere la posibilidad de una interacción del catión con el oxígeno del DMSO, utilizando éste en la formación del puente adicional entre los dos iones metálicos.

De nuevo se obtienen especies aniónicas con alto grado de coordinación de hidróxido, tal como $\text{Ca}_2(\text{OH})_5^-$. Es probable que la formación de este tipo de complejos se deba al alto grado de desestabilización de hidróxido, por lo que este catión tiende a formar especies oligoméricas con una mayor dispersión de carga dentro de la molécula.

5.1.3 Sr^{2+}

En la titulación de iones Sr^{2+} se observó una gran discrepancia en los resultados. Una de las razones es el alto valor de pK_a de las especies que se forman. Estas especies tienen que ser registradas a valores de pH elevados, con baja concentración de H^+ , creando así la dispersión en datos debido a los problemas de detección de bajas concentraciones de protones. No se pudo elevar la concentración del metal, para aumentar el grado de formación de complejos formados y así llegar a valores de pH más bajos, debido a la formación de precipitado de $\text{Sr}(\text{OH})_2$. En este caso no se tomaron los valores promedio de cada titulación y se utilizaron en cálculos futuros los valores obtenidos en la titulación de Sr^{2+} 2 mM. Esta concentración de metal fue la más alta, por lo que se considera que las concentraciones de especies formadas también eran las más elevadas, además de que se registraron con mayor grado de precisión.

Tabla 5.3 Resultados de titulaciones potenciométricas de $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ calculados con el programa Hyperquad2000 de las curvas potenciométricas obtenidas a 3 concentraciones diferentes del metal en presencia de HClO_4 1 mM titulado con Bu_4NOH

Constante	Sr^{2+} 0.5 mM.	Sr^{2+} 1 mM	Sr^{2+} 2 mM
K_w	-22.0000	-22.3315	-21.402
$\text{K}_{\text{Sr}_2\text{OH}}$	-6.4097	-7.8267	-9.8966

K_{SrOH}	-11.3720	-13.3375	-14.8546
K_{SrOH_3}	-45.23	-48.4501	-47.9350
$K_{\text{Sr}_2\text{OH}_5}$	-76.000	-76.3311	-75.8052

La especie $\text{Sr}(\text{OH})_2$ no existe en los ajustes realizados y es probable que se encuentre en concentraciones muy bajas en disolución. Sin embargo, se observa el precipitado de $\text{Sr}(\text{OH})_2$, por lo cual, es probable que la ausencia de $\text{Sr}(\text{OH})_2$ se deba a la baja solubilidad de éste.

Al igual que en el caso de Ca^{2+} se observa la formación de una especie dimérica $\text{Sr}_2\text{OH}^{3+}$ a bajas concentraciones de hidróxido. Nuevamente, es probable que el hidróxido funcione como el puente entre los dos iones metálicos. El radio iónico es más grande que el encontrado para el catión Ca^{2+} , ya que lleva a mayor dispersión de carga y menor disminución de la nucleofilia del hidróxido unido al metal, esto contribuye a que la constante de formación del complejo sea más elevada.

El Sr^{2+} es un ácido de Lewis débil que desplaza la mayoría de hidroxio especies a valores de $\text{pH} > 16$. Este pH es inalcanzable en agua y corresponde a un pH moderadamente alcalino en DMSO 90% (Figura 5.3).

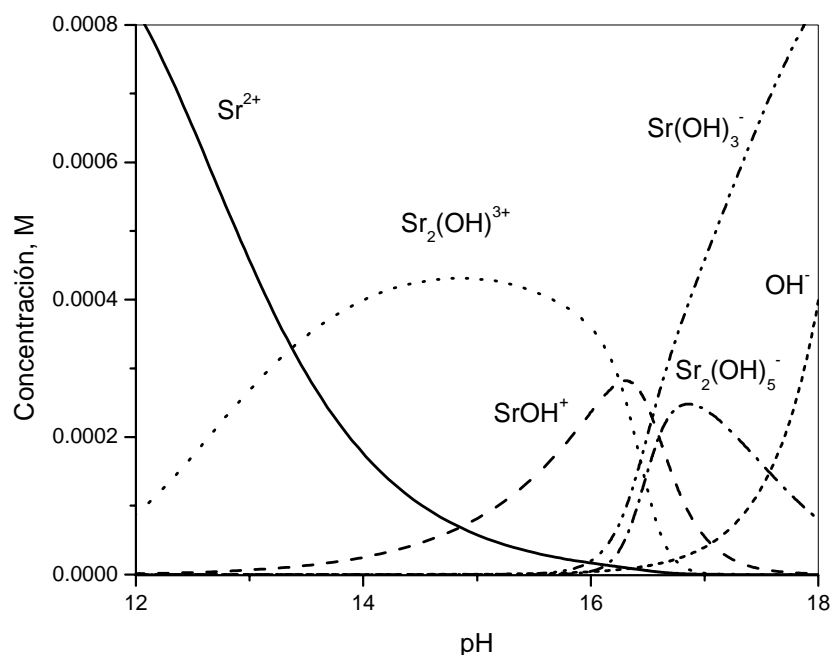


Figura 5.3 Distribución de hidroxocomplejos de Sr²⁺ como función de pH calculada para 1 mM del metal.

5.1.4. Resumen y conclusiones de titulaciones potenciométricas

Al cambiar de medio, las constantes de acidez de monohidroxocomplejos de los metales alcalinotérreos han crecido en promedio un orden de magnitud. Por otro lado las constantes de formación de hidroxocomplejos aumentaron de una manera significativa. Para ver este efecto, se calcularon los valores de constantes de formación a una concentración de agua constante e igual a 1.

$$K_f = \frac{[M_x(OH)_y]^{2x-y}}{[M^{2+}]^x [OH^-]^y} = \frac{[M_x(OH)_y]^{2x-y} [H^+]^y}{[M^{2+}]^x K_w^y} = \frac{K_{xy}}{K_w^y} \quad (5.1)$$

K_f es la constante de formación de la especie de interés y K_{xy} es la constante de formación de la especie $M_x(OH)_y^{2x-y}$ obtenida de los datos experimentales mediante un ajuste con Hyperquad2000 (tablas 5.1-5.3).

A partir de los valores de las Tablas 5.1-5.3 y la ecuación 5.1, y empleando el valor promedio de $\log K_w$ igual a -21.7 ± 0.3 , se obtienen las constantes de formación de la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 Constantes de formación de hidroxocomplejos de metales alcalinotérreos en DMSO 90 %

Especies	$\log K_f (M^{2+} = Mg^{2+})$	$\log K_f (M^{2+} = Ca^{2+})$	$\log K_f (M^{2+} = Sr^{2+})$
M_2OH^{3+}	-	14	12.1
MOH^+	10.54	10.3	7.15
$M(OH)_2$	21.49	17.99	-
$M_2(OH)_5^-$	50.84	43	34.19
$M(OH)_3^-$	25.38	-	18.06

Al comparar esta tabla con la Tabla 2.5, se observa que las constantes de formación de los hidroxocomplejos han aumentado más de 7 órdenes de magnitud, principalmente debido a la desestabilización del ion hidróxido. Los valores de las constantes disminuyen de Mg^{2+} a Sr^{2+} . A diferencia del agua, en DMSO 90% existen complejos aniónicos con 3 OH^- coordinados a un metal y se tiene la formación de complejos diméricos. Las especies neutras poco solubles en agua, tales como $Mg(OH)_2$ y $Ca(OH)_2$ presentan alto grado de solubilidad en la mezcla de disolventes, por otro lado, el dihidróxido de Sr^{2+} , con buena solubilidad en agua, es poco soluble en DMSO 90 %.

El pH del medio donde existen los monohidroxocomplejos corresponde a un medio neutro en el caso de Mg^{2+} y Ca^{2+} , y débilmente alcalino en el caso de Sr^{2+} . Por lo que al cambiar de disolvente, se tienen especies activas de metales biológicos Ca^{2+} y Mg^{2+} en medio neutro o débilmente básico.

¿Podría tener esto tener alguna utilidad biológica? Si se supone que en el interior de la enzima no se encuentra un medio acuoso, sino un medio con constante dieléctrica más baja que está en equilibrio con agua. A pH neutro en agua se observaría un pH cercano a 12 (si el interior se comporta igual que DMSO 90%) en el interior de la enzima. A este pH existirían los complejos activos de Mg^{2+} o Ca^{2+} en altas concentraciones dentro

del sitio activo de la enzima, mientras que el derredor se encuentra saturado de agua, por lo que los metales existirían como iones libres. De tal forma que es posible considerar que la formación eficiente de especies activas en la naturaleza depende de una ligera variación en las propiedades del medio, con ello se evita plantear mecanismos de reacción demasiado elaborados. Esta hipótesis necesita futuras corroboraciones, las cuales pueden ser abordadas por cálculos de química teórica, pero estas demostraciones irían más allá de lo que abarca el presente trabajo.

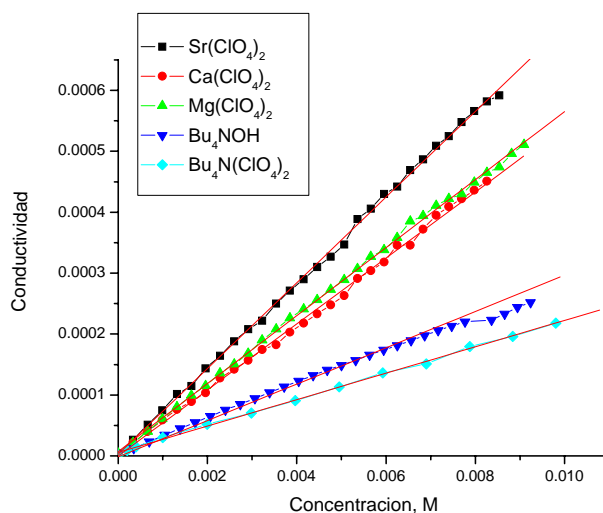
En el caso del ion Mg^{2+} , el monohidroxocomplejo dismuta para dar el dihidroxocomplejo. Este fenómeno es difícil de explicar. Probablemente se deba a la alta densidad de carga sobre el anión y a la gran desestabilización del hidróxido, lo que hace más favorable la existencia de una especie neutra que de un par catión y anión. Para los dos restantes iones más grandes y con carga más dispersa existen especies M_2OH^{3+} . Es probable que Mg^{2+} sea incapaz de formar este tipo de especies debido a la fuerte desactivación de hidróxido, ya que no es capaz de formar un puente entre dos iones metálicos. Al comparar los valores de constantes de formación, se tiene la impresión de que el ion Ca^{2+} se comporta de una manera análoga a la del Mg^{2+} , ya que los constantes de formación del monohidroxocomplejo son muy cercanas. Probablemente es un efecto aparente, ya que posiblemente la constante de formación del monohidroxocomplejo de Mg^{2+} sea más baja de la que podría esperarse. En general, el comportamiento del ion Ca^{2+} ocupa un lugar intermedio entre los otros dos iones metálicos.

5.2 Titulaciones conductimétricas

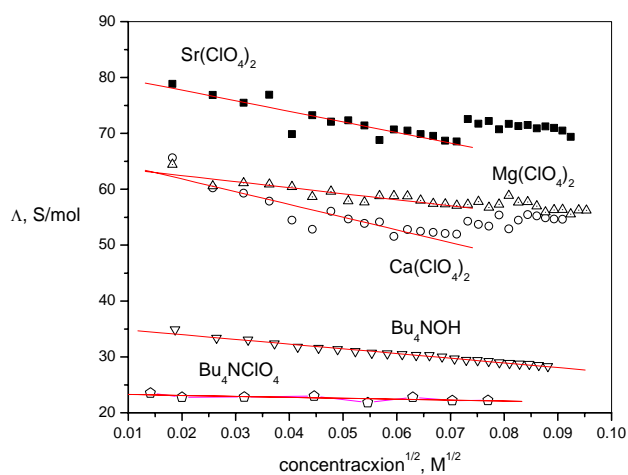
La dispersión de datos observada en el caso de titulaciones potenciométricas y diferencia de especies observadas en DMSO 90% y agua nos obliga a buscar otros métodos de caracterización del sistema. Uno de estos métodos fue la conductimetría.

Las mediciones conductimétricas son más sensibles al grado de la no idealidad del medio que los valores obtenidos por potenciometría. Por otro lado, en este caso la medición es afectada en menor grado por el comportamiento del electrodo, ya que lo

único importante es la concentración y movilidad de los iones presentes en la disolución. Las especies iónicas ocupadas en el experimento fueron caracterizadas en base a su conductividad molar a partir de mediciones presentadas en la figura 5.4A, y a la conductividad molar límite, para ello es necesario emplear la expresión de la ley de Kohlrausch del capítulo 4.



A



B

Figura 5.4 A Dependencia de la conductividad medida en la concentración de electrolito. B. Conductividades molares en coordenadas de la ecuación 4.7.

Tabla 5.5. Parámetros conductimétricos de las sales de metales alcalinotérreos, base y electrolito de soporte en DMSO 90 % v/v.

Especie	Λ_0 , S cm ² mol ⁻¹	A, S cm ² mol ^{-3/2}
Bu ₄ NOH	35.6	84.14
Bu ₄ NClO ₄	23.44	16.84
Mg(ClO ₄) ₂	63.34	78.46775
Ca(ClO ₄) ₂	66.39	227.68775
Sr(ClO ₄) ₂	81.49	188.95782

La conductividad molar límite de las sales de metales alcalinotérreos aumenta conforme aumenta el radio metálico. La conductividad molar límite para los electrolitos 2:1 es aproximadamente 2 veces más alta que para los electrolitos 1:1. Como se puede ver de la figura 5.4A, en el intervalo de concentraciones seleccionadas el valor de la pendiente prácticamente no cambia, lo que nos permite considerar la relación lineal entre la concentración de la especie y su conductividad. Para futuros cálculos se puede considerar que la conductividad de los electrolitos cambia de manera lineal con respecto a la raíz cuadrada de la concentración, cuando ésta es menor de 5 mM.

Las titulaciones conductimétricas de sales de metales alcalinotérreos con hidróxido de tetra(n-butil)amonio no dieron mucha información aparte de un mínimo pronunciado en todos los casos. Se puede observar que los mínimos de conductividad se presentan en la relación M:OH 1:2 para Mg²⁺ (Figura 5.5) y Ca²⁺ (Figura 5.6) y 1:2.5 para Sr²⁺ (Figura 5.7). Estos datos correlacionan con los datos de titulación de los metales alcalinotérreos, sobre todo con la ausencia de la partícula soluble Sr(OH)₂ en disolución.

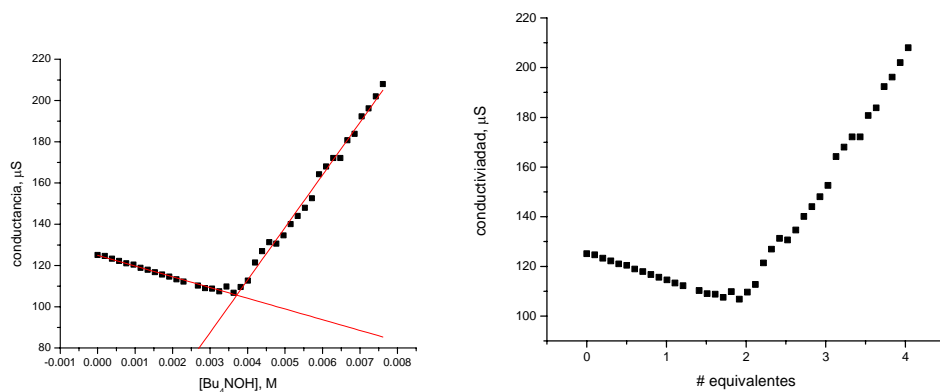


Figura 5.5 Titulación conductimétrica de una solución 2 mM de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ con Bu_4NOH en DMSO 90% en función de concentración de Bu_4NOH y el número de equivalentes de base añadidos.

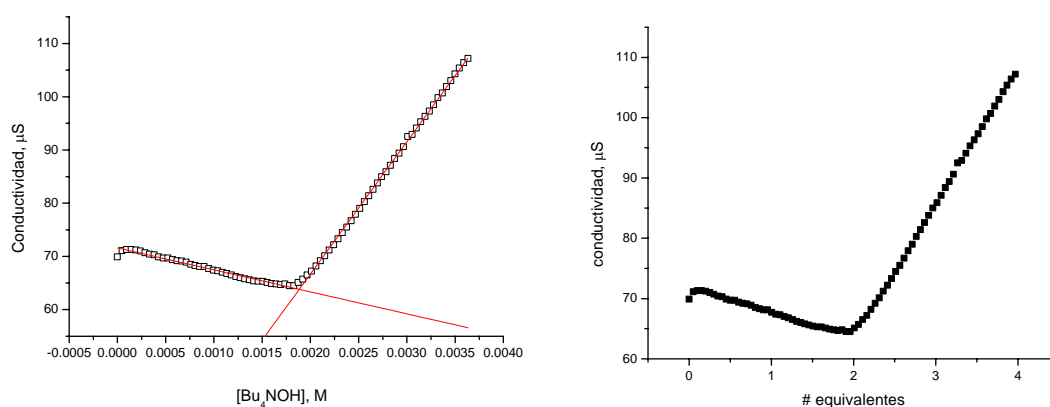


Figura 5.6 Titulación conductimétrica de 1 mM de $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ con Bu_4NOH en DMSO 90% en función de concentración de Bu_4NOH y el número de equivalentes de base añadidos.

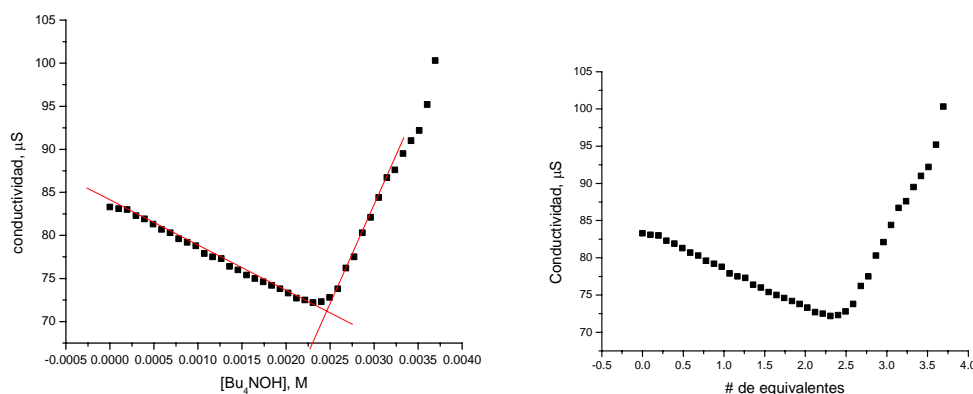


Figura 5.7 Titulación conductimétrica de 1 mM de $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ con Bu_4NOH en DMSO 90% en función de concentración de Bu_4NOH y el número de equivalentes de base añadidos.

El siguiente análisis de los datos es cualitativo y sólo puede indicar la presencia o ausencia de otras partículas y no de sus concentraciones o constantes de formación. Después del mínimo, las pendientes obtenidas a partir de los ajustes lineales de los datos experimentales son menores a las esperadas para el simple aumento de la concentración de hidróxido libre, lo que indica la formación de otras especies cargadas, probablemente $\text{M}(\text{OH})_3^-$ encontradas en titulaciones potenciométricas.

Las pendientes de los ajustes antes del mínimo son muy bajas comparándolas con el cambio de conductividad como función de concentración de metales alcalinotérreos. Al llevar a cabo la titulación se forma una nueva sal; Bu_4NClO_4 , por lo que el cambio de conductividad (χ) puede ser atribuida a la disminución de la concentración de la especie $\text{M}(\text{ClO}_4)_2$, al aumento de la concentración de la especie Bu_4NClO_4 y a la aparición de diferentes complejos metálicos de estequiometría desconocida $\text{M}_n(\text{OH})_m^{2n-m}$, de tal forma que la conductividad total puede ser calculada a partir de la fórmula 5.2.

$$\chi = \frac{\lambda_{\text{M}(\text{ClO}_4)_2} \left[\text{M}(\text{ClO}_4)_2 \right]_0 - 1/2 [\text{Bu}_4\text{NOH}] + \lambda_{\text{Bu}_4\text{N}(\text{ClO}_4)} [\text{Bu}_4\text{NClO}_4] + \sum \lambda [\text{M}_n\text{OH}_m^{2n-m}]}{1000} \quad (5.2)$$

λ_x corresponde a la conductividad molar de especies correspondientes y 1000 es el factor de corrección

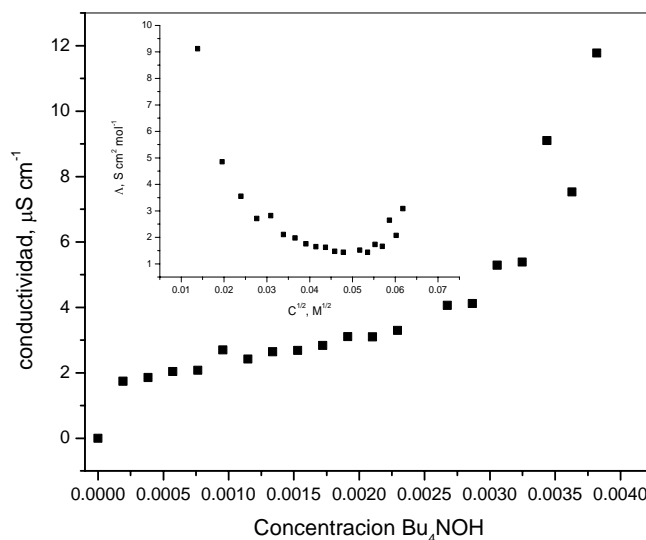


Figura 5.8. Conductividad residual calculada a partir de la fórmula 5.2 para la titulación de 2 mM de Mg^{2+} con Bu_4NOH y la conductividad molar asociada a las partículas formadas durante la titulación antes del punto de equivalencia.

De esta manera se puede estimar la conductividad residual de las partículas antes del mínimo de la titulación. En el caso de Mg^{2+} (Figura 5.8) la conductividad asociada a las especies presentes al inicio de la titulación, calculada de esta manera, indica una especie con la conductividad igual a $2.92 \mu\text{S}$, lo que es muy bajo para una especie con carga negativa. El cálculo de la conductividad molar como función del cuadrado de la concentración de especies formadas indica una especie con Λ_0 igual a $16 \text{ S cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Este valor podría indicar la presencia de una partícula con carga $1+$ en presencia de partículas neutras. Este resultado comprueba los datos potenciométricos, indicando que a concentraciones de base bajas, la partícula formada es MgOH^+ que dismuta a Mg(OH)_2 y Mg^{2+} .

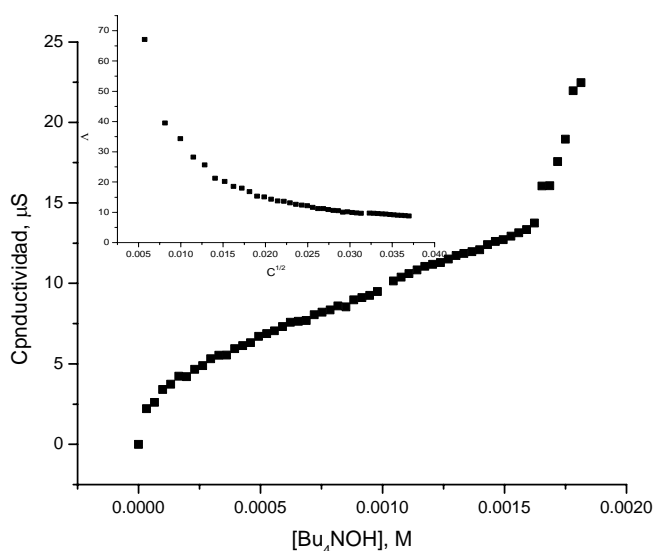


Figura 5.9. Conductividad residual calculada a partir de fórmula 5.2 para la titulación de una solución 1 mM de Ca^{2+} con Bu_4NOH y conductividad molar asociada a las partículas formadas durante la titulación antes del punto de equivalencia.

El mismo análisis hecho con Ca^{2+} (Figura 5.9) presenta un crecimiento de la conductividad muy rápido, asociado a las especies desconocidas cuando la concentración de hidróxido es 0.0005 M (la mitad de la concentración del metal presente), después se observa saturación correspondiente a una especie de conductividad baja (formación simultánea de CaOH^+ y $\text{Ca}(\text{OH})_2$) y el posterior crecimiento de conductividad que puede ser atribuido a la presencia de OH^- libre y a otras especies aniónicas. El análisis de la conductividad molar a dilución infinita señala un valor elevado (120 S/mol), que podría ser una indicación de la existencia de especies con carga elevada tipo $\text{Ca}_2\text{OH}^{3+}$.

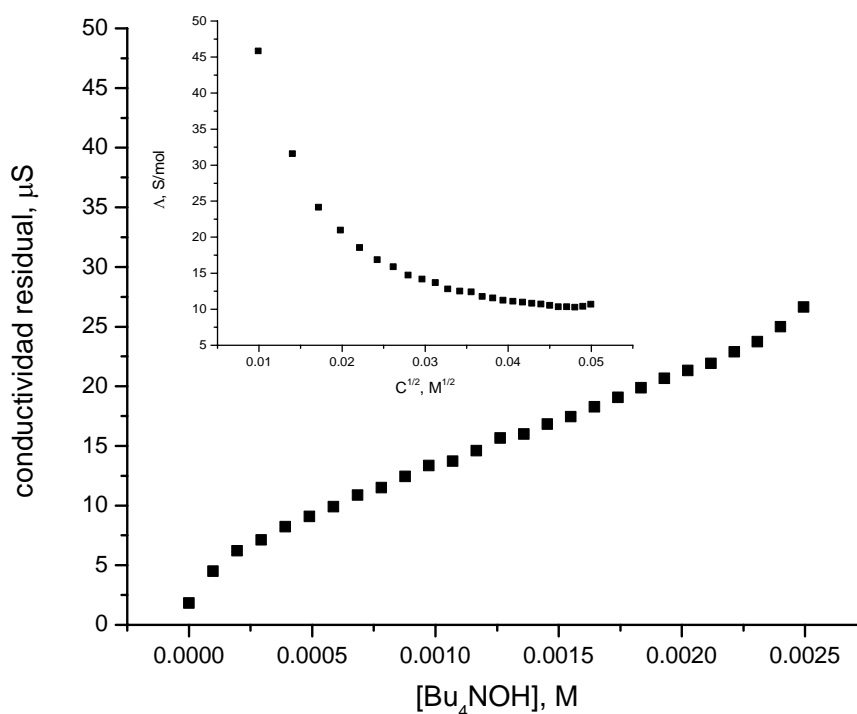


Figura 5.10. Conductividad residual calculada a partir de la fórmula 5.1 para la titulación de una solución 1 mM de Sr^{2+} con Bu_4NOH

El mismo tratamiento en el caso de Sr^{2+} (Figura 5.10) señala la formación de una especie con conductividad a dilución infinita igual a 75 S/mol, que podría indicar una especie con carga 2 o una mezcla de partículas con cargas 3 y 1. El mínimo pronunciado en 2.5 equivalentes de hidróxido señala la ausencia de la partícula $\text{Sr}(\text{OH})_2$.

La conductimetría comprueba la formación de especies neutras solubles en DMSO 90 % con alto valor de constante de formación. Los metales alcalinotérreos Ca^{2+} y Sr^{2+} tienden a formar pares iónicos a concentraciones de la sal mayores de 5 mM. Esta tendencia es menor en el caso de Mg^{2+} , Bu_4NOH y la sal Bu_4NClO_4 . Por evidencias indirectas, existen especies $\text{M}(\text{OH})_n^{2-n}$ (donde $n > 2$) a altas concentraciones de hidróxido. Por otra parte, cuando las concentraciones de hidróxido son bajas (menores que la mitad

de la concentración de metal), en el caso de Ca^{2+} y Sr^{2+} existen las especies con carga elevada, tales como M_2OH^{3+} o M_3OH^{5+} .

5.3 Estimación de la constante de unión al sustrato por RMN

Para que la reacción ocurra es necesario que la especie activa se una al sustrato. La constante de unión entre el compuesto aniónico (sustrato) y catiónico (catalizador) va a depender del medio; solvatación de componentes, permeabilidad eléctrica, fuerza iónica. Nuestra primera aproximación al mecanismo de actividad de hidroxocomplejos de metales alcalinotérreos se presenta en la figura 5.11

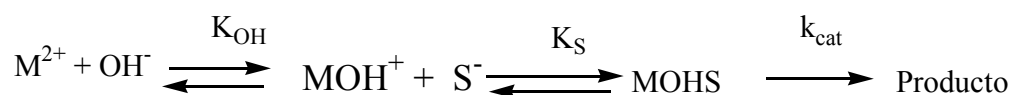


Figura 5.11 Probable mecanismo de reacción.

La formación de un complejo catalizador-sustrato lleva a la saturación tipo Michaelis –Menten de la rapidez de la reacción. Por otra parte, se estima que la velocidad de reacción está relacionada con la fuerza de unión del catalizador al estado de transición y es inversamente proporcional a la constante de equilibrio entre el catalizador y el sustrato en el estado basal (ecuación 5.3),

$$\begin{aligned} \text{velocidad} &= k_{\text{obs}} [\text{S}] = k_{\text{cat}} [\text{MOHS}] = k_{\text{cat}} K_{\text{S}} [\text{MOH}^+][\text{S}] = k_{\text{cat}} K_{\text{OH}} K_{\text{S}} [\text{M}^{2+}][\text{OH}^-][\text{S}] \\ k_{\text{cat}} &= \frac{k_2}{K_{\text{S}}} \end{aligned} \tag{5.3}$$

Donde k_{obs} es la constante observada de primer orden, k_{cat} es la constante catalítica de primer orden correspondiente a la reacción realizada por el complejo activo MOHS, K_{S} es la constante de formación del complejo activo MOHS, K_{OH} corresponde a la formación de MOH^+ y k_2 es la constante catalítica de segundo orden para la reacción llevada a cabo con el sustrato libre y el hidróxido del metal.

Es necesario estimar el valor de la constante de unión del metal al sustrato. La constante no puede ser medida directamente debido a la hidrólisis del sustrato. Para estimar este valor se utilizaron las sales de los metales (los cuales tienden a unirse más fuertemente a un sustrato cargado ya que poseen mayor densidad de carga). Como sustrato fue elegido el fosfodiéster BNPP, que tiene la constante de hidrólisis baja, es soluble en agua y DMSO 90% y es fácil de seguir por el cambio en desplazamientos de señal de ^{31}P .

El cambio del desplazamiento depende de la concentración del ion metálico, presentando a altas concentraciones una saturación tipo Michaelis-Menten. El cambio en el desplazamiento químico (desplazamiento relativo) fue ajustado a la ecuación 5.4

$$\Delta\delta = \frac{\delta_{\text{fin}} K_{\text{MS}} [M^{2+}]}{1 + K_{\text{MS}} [M^{2+}]} \quad (5.4)$$

donde $\Delta\delta$ es el cambio en desplazamiento, δ_{inf} es el cambio en desplazamiento de la señal a concentración de metal infinita y K_{MS} es la constante de formación del complejo metal – sustrato.

Las titulaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20°C). Los experimentos en agua deuterada se realizaron utilizando una solución 10 mM de BNPP (sal de sodio) en el caso de Mg^{2+} y Sr^{2+} . En el caso de Ca^{2+} se observó un precipitado y sólo fue posible medir el desplazamiento en dos puntos. Los experimentos en DMSO-d_6 / D_2O 90/10 % se realizaron con la solución de BNPP 10 mM en cada caso, mientras que la concentración del ion metálico variaba. Las mediciones se llevaron a cabo mediante la resonancia de ^{31}P utilizando H_3PO_3 como estándar. Se informan cambios en desplazamiento de la banda de fósforo de BNPP puro correspondiente a -10.4948 ppm. Los resultados de ambas titulaciones se presentan en la tabla 5.6

Tabla 5.6 Desplazamientos relativos de la banda de fósforo en RMN ^{31}P correspondiente a 10 mM de BNPP, en agua y DMSO 90% deuterados como función de la concentración de percloratos de metales alcalinotérreos

AGUA				DMSO 90%			
$[\text{M}^{2+}]$, M	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Sr^{2+}	$[\text{M}^{2+}]$, M	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Sr^{2+}
0	0	0	0	0	0	0	0
0.05	-0.0429	-0.0858	0	0.005	-0.061		
0.1	-0.0858	-	-0.04632	0.01	-0.086	-0.176	-0.368
0.3	-0.2573	-0.2141	-0.13242	0.02	-0.232	-0.69	-0.398
0.5	-0.3859	-	-0.21077	0.03	-0.237	-0.866	-0.483
K_{MS} , M^{-1}	0.4544	7.81242	0.2534	0.04	-0.413	-1.057	-0.564
$\Delta\delta_{\text{inf}}$	-2.09584	-0.30545	-1.87419	0.06	-0.378	-1.238	-0.639
				K_{MS} , M^{-1}	18.3	24.36	37.3
				$\Delta\delta_{\text{inf}}$	-0.78	-2.09	-0.93

Las constantes de formación de los complejos metal-sustrato y el desplazamiento máximo de la banda de fósforo fueron calculados a partir de ajustes a la ecuación 5.4, como se observa en la Figura 5.12.

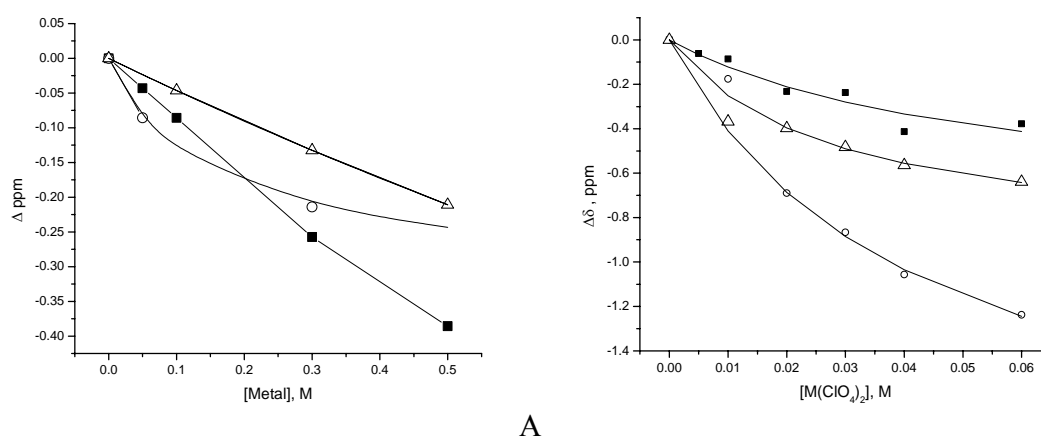


Figura 5.12 Formación de los complejos MBNPP^+ a partir de la saturación del desplazamiento de la señal en la titulación por RMN ^{31}P en agua deuterada (A) y en DMSO- d_6 90 % (B). En ambos casos los cuadrados negros corresponden a Mg^{2+} , círculos a Ca^{2+} y triángulos a Sr^{2+} . Las líneas negras corresponden a los ajustes de los resultados experimentales a la ecuación del tipo Michaelis – Menten.

La constante de formación del complejo de Ca^{2+} en agua presentó un valor alto: 7.81 M^{-1} . Sin embargo, este resultado no es confiable debido a la distorsión de resultados por precipitación de la sal neutra. Es probable, que el valor de la constante de formación del complejo para Ca^{2+} tome una posición intermedia entre Mg^{2+} y Sr^{2+} .

El valor del cambio del desplazamiento máximo en agua se incrementa al aumentar la constante de formación de los complejos. Sin embargo, al pasar a DMSO aunque la constante de unión aumenta, el cambio de desplazamiento máximo disminuye. No existe una explicación simple para esto. Probablemente en DMSO el metal se une al sustrato mediante un puente de disolvente y no directamente, lo que afecta el cambio en el desplazamiento de la señal.

El valor absoluto de la constante de formación de los complejos metal-sustrato aumenta al cambiar del agua a DMSO 90% y el orden en el incremento de este valor se invierte. Probablemente esto se deba al cambio en las esferas de solvatación de los metales. El efecto catalítico infligido por el cambio de la constante de unión del metal-sustrato puede ser menor de 40 veces para el ion Mg^{2+} y 150 veces para el ion Sr^{2+} . Es probable que el efecto para el ion Ca^{2+} tome un valor intermedio. La unión del hidroxocomplejo metálico al sustrato probablemente sea más débil que para el catión metálico libre.

Ya que en experimentos cinéticos se están empleando concentraciones milimolares de metal y micromolares del sustrato, la unión catalizador-sustrato puede ser despreciada y en los experimentos posteriores no se esperan saturaciones de tipo Michaelis-Menten.

Capítulo 6

Hidrólisis básica de los sustratos

Nuestro grupo de trabajo ha determinado la actividad catalítica de hidroxocomplejos de metales alcalinotérreos en agua a 70°C y en DMSO 90 % a 25°C. En el presente trabajo se ha decidido llevar a cabo todos los experimentos a 37°C debido a que la solubilidad de los hidroxocomplejos en estas condiciones es mayor y la viscosidad del medio es menor a la presentada a temperatura ambiente, lo que facilita el monitoreo de la hidrólisis. El uso de temperaturas debajo de 70°C disminuye el error experimental por evaporación de disolvente. Por otro lado, a 37°C se encuentra el cuerpo humano, donde ocurren las reacciones bioquímicas que estamos tratando de simular. La medición de la hidrólisis acuosa de los sustratos fue necesaria sobre todo para comparar los valores obtenidos con los valores informados en la literatura, además de que se tiene un punto de referencia que corroboraría que el sistema seleccionado funciona correctamente y no está contaminado por algún tipo de compuestos que actúen como catalizadores.

6.1 Hidrólisis de ésteres fosfato en agua.

La hidrólisis básica de ésteres fosfato BNPP, HpNPP y PNPDP (Figura 2.4) se estudió en agua a 37°C. Para cada sustrato se varió la concentración de la base (NaOH en el caso de BNPP y Bu₄NOH en el caso de HpNPP y PNPDP), mientras que la concentración del sustrato se mantuvo constante. La velocidad de la reacción se calculó a partir del ajuste lineal a velocidades iniciales (Ecuación 4.1) para el BNPP, mientras que para los otros dos sustratos se ajustó a la ecuación de la velocidad integral de primer orden (Ecuación 4.2). El PNPDP no es soluble en agua, por lo cual fue necesario utilizar 10 % en volumen de CH₃CN para llevar a cabo la reacción. Los resultados experimentales son los siguientes.

Tabla 6.1. Resultados de la hidrólisis acuosa de ésteres fosfato.

<i>BNPP</i>		<i>HpNPP</i>		<i>PNPDPP</i>	
OH ⁻ , M	k _{obs} , s ⁻¹	OH ⁻ , M	k _{obs} , s ⁻¹	OH ⁻ , M	k _{obs} , s ⁻¹
0.005	8.11×10 ⁻⁸	0.001	2.1×10 ⁻⁴	0.001	6.9×10 ⁻⁴
0.01	3.16×10 ⁻⁷	0.003	2.8×10 ⁻⁴	0.002	1.74×10 ⁻³
0.02	6.59×10 ⁻⁷	0.005	4.3×10 ⁻⁴	0.003	2.58×10 ⁻³
0.03	9.81×10 ⁻⁷	0.007	6.6×10 ⁻⁴	0.004	2.87×10 ⁻³
0.04	1.46×10 ⁻⁶	0.01	9.6×10 ⁻⁴	0.005	3.73×10 ⁻³
0.05	1.83×10 ⁻⁶	0.015	1.54×10 ⁻³	0.006	3.58×10 ⁻³
0.06	2.23×10 ⁻⁶	0.02	1.97×10 ⁻³		
0.07	2.47×10 ⁻⁶				

En todos los casos la constante de la velocidad de hidrólisis alcalina k_{OH} (M⁻¹s⁻¹) se calculó a partir de la relación lineal entre k_{obs} (s⁻¹) y la concentración de hidróxido presente en cada experimento (Figura 6.1)

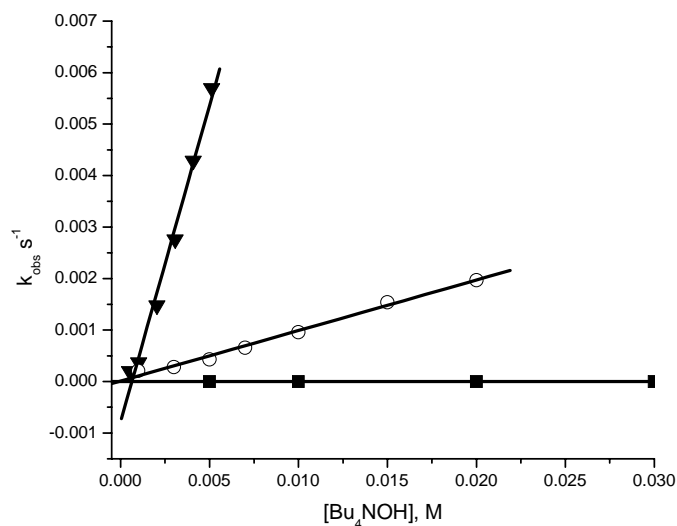


Figura 6.1 Hidrólisis alcalina de los sustratos en agua a 37 °C: BNPP (cuadrados), HPNPP (círculos) y PNPDP (triángulos)

Para el BNPP la constante de la hidrólisis alcalina fue de $3.76 \pm 0.09 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. De los datos de la literatura en agua a 35°C $k_{\text{OH}} = 2.4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁽⁵⁷⁾

El sustrato HpNPP presenta la constante del segundo orden igual a $0.099 \pm 0.004 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El valor de literatura a 25°C es de $0.0672 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^(9e), lo que correlaciona bastante bien con los resultados obtenidos. Como podemos observar, la aparición del grupo 2-hidroxi en HpNPP lleva a un aumento en la reactividad de 100 veces comparado con BNPP, sustrato con el cual tienen el mismo grupo saliente (*p*-nitrofenolato).

La constante de la hidrólisis alcalina del triéster fosfato fue de $1.22 \pm 0.07 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que es más de lo que se esperaría, ya que el valor de literatura es de $0.35 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C ,^(9h) aunque las condiciones de reacción en este caso también difieren de las informadas en la literatura.

Las constantes observadas en todos los casos resultaron ser cercanas a los valores de la literatura. Esto indica que los sustratos obtenidos no presentan ninguna impureza que afectaría la reacción. Todos los sustratos comparten el mismo grupo saliente (el nitrofenolato), que contribuye en el mismo grado a la velocidad de hidrólisis de los sustratos. Sin embargo, el mecanismo de la hidrólisis en los tres casos es diferente. Para el BNPP y PNPDP el mecanismo incluye un ataque nucleofílico al fósforo. Sin embargo, la carga negativa sobre el fosfato en el caso de BNPP hace que este sustrato se hidrolice 10^4 veces más lento que el triéster. Por otra parte, el HpNPP se hidroliza mediante un ataque intramolecular del 2-hidroxilo desprotonado por la base. El nucleófilo interno permite elevar la rapidez de la reacción casi 10^3 veces en comparación con el sustrato más inactivo, que es el BNPP.

6.2. Hidrólisis de ésteres fosfato a concentraciones de DMSO variables

Los tres sustratos modelo aumentan su velocidad de reacción al cambiar el medio de agua desionizada a las mezclas de DMSO-agua. Esto se debe principalmente a la desestabilización de los reactivos (el ion hidróxido y en el caso de los diésteres el

sustrato). También se ha encontrado, que para un buen grupo saliente, tal como el nitrofenolato, la dispersión de la carga sobre el oxígeno cargado en mono y diésteres fosfato lleva a la elongación del enlace P-O del grupo saliente, facilitando de esta manera su salida.⁽⁴⁵⁾ Por otra parte, el ataque directo sobre el fósforo en el caso de BNPP se vuelve menos favorable en DMSO vs. H₂O debido al aumento de la repulsión entre cargas iguales. Por lo tanto, es probable que en este caso el efecto acelerador del disolvente estará compensado con la incrementada dificultad de realizar un ataque nucleofílico. Para los sustratos HpNPP y PNPDP este efecto no existe ya que el ataque para el primero no es directo, y el segundo no posee ninguna carga negativa para proteger el enlace. Para diésteres fosfato las constantes de segundo orden calculadas a partir de las constantes observadas correspondientes y las concentraciones conocidas de las bases se presentan en la tabla 6.2

Tabla 6.2 Efecto de DMSO sobre la cinética de la hidrólisis de BNPP en presencia de 0.075 M Bu₄NOH y HpNPP con 0.001 M de Bu₄NOH

Fracción volumen DMSO	fracción mol	BNPP, $k_2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	HpNPP, $k_2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
0	0	3.7×10^{-5}	0.21
0.1	0.02733	2.61×10^{-5}	0.1
0.2	0.05947	2.03×10^{-5}	0.09
0.3	0.0978	1.88×10^{-5}	0.14
0.4	0.14429	1.67×10^{-5}	0.11
0.5	0.20187	1.54×10^{-5}	0.13
0.6	0.27504	1.21×10^{-5}	0.2
0.7	0.37113	1.78×10^{-5}	0.36
0.8	0.50291	2.15×10^{-5}	0.34
0.85	0.58902	3.67×10^{-5}	0.68
0.87	0.62862	4.78×10^{-5}	2.03
0.9	0.69478	7.95×10^{-5}	3.37
0.92	0.74415	1.22×10^{-4}	6.75
0.94	0.79849	1.88×10^{-4}	13.17
0.95	0.82775		14.87
0.96	0.85856	3.05×10^{-4}	30
0.97	0.89104		53.76
0.98	0.92534		63.96

Las gráficas de las constantes de segundo orden en coordenadas de la fracción volumen y fracción mol de DMSO revelan un crecimiento brusco en la constante

catalítica a partir de 80 % v/v del disolvente para ambos sustratos (Figura 6.2 y 6.3). Sin embargo, en coordenadas de fracción mol, observamos que esta concentración corresponde aproximadamente a 50 % de DMSO y que la constante catalítica en ambos casos empieza a aumentar de manera logarítmica en función de la fracción mol del disolvente. Es probable que esto se deba a la activación del hidróxido, atribuida posiblemente a la pérdida de los enlaces de hidrógeno que éste forma con el agua presente en el disolvente.

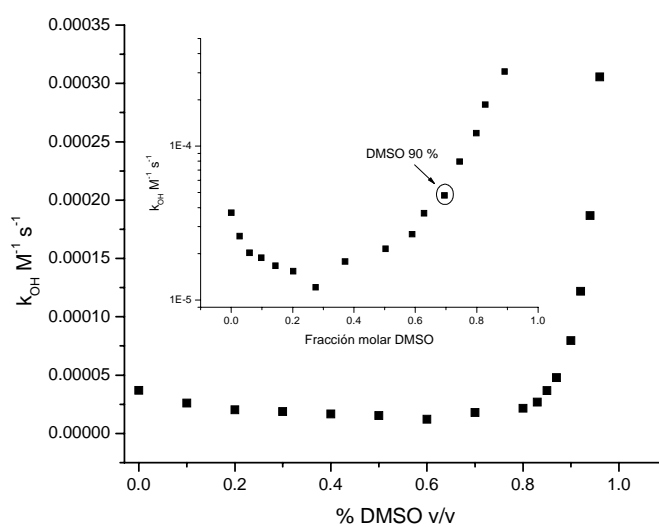


Figura 6.2 Hidrólisis de BNPP como función de % v/v de DMSO y fracción mol del disolvente.

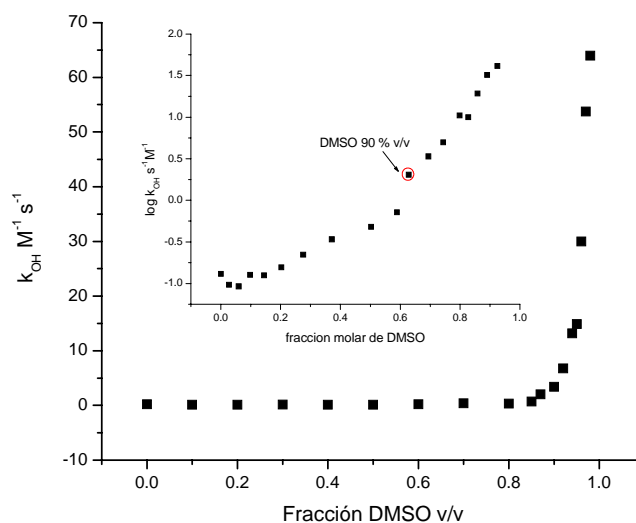


Figura 6.3 Hidrólisis de HpNPP como función de % v/v de DMSO y fracción mol del disolvente.

Los tres sustratos se hidrolizan mejor en DMSO acuoso que en agua. La concentración de DMSO 90 % v/v fue elegida para futuros estudios como un valor intermedio donde se observa buena solubilidad de los hidróxidos metálicos, además de que los cationes ya están prácticamente deshidratados. Esta concentración de agua corresponde a un valor de DMSO “saturado” con agua, por lo cual es más fácil conservar los disolventes *stock* con la concentración de agua requerida, ya que en este caso el disolvente deja de absorber el agua del aire y así su composición se mantiene controlada por un tiempo prolongado.

El estudio detallado de la hidrólisis de PNPDP no se llevó a cabo debido a baja solubilidad del sustrato a altas concentraciones de agua. En la literatura se informa el efecto de DMSO para la hidrólisis de diferentes ésteres fosfato – paraxón y paratión, presentando la misma forma de dependencia de velocidad de reacción en función de la concentración de DMSO que BNPP.⁽⁴⁶⁾ Las constantes de la hidrólisis básica en DMSO 90% se han utilizado como puntos de referencia para futuros estudios, y se han estudiado con mayor detalle.

Tabla 6.3 Hidrólisis básica de 0.00002 M de PNPDP en DMSO acuoso 90 % v/v.

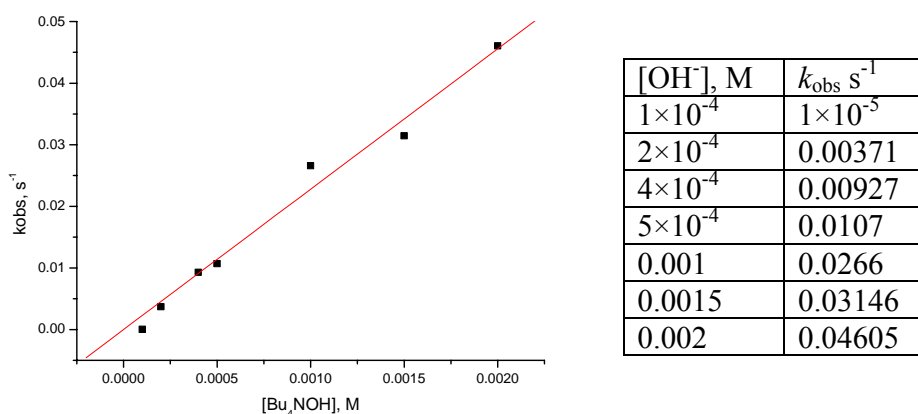


Figura 6.4 Hidrólisis básica de 0.02 mM PNPDP en DMSO acuoso 90 % v/v.

El resultado del ajuste lineal en este caso es la constante de velocidad de segundo orden $22.8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esto quiere decir que el aumento total de la velocidad de la reacción es de 20 veces en comparación con agua. En el caso de BNPP este aumento es de 4 veces y para HpNPP de 30 veces. El efecto más bajo para BNPP probablemente se deba a la mayor contribución de la repulsión entre cargas similares de los reactivos en el medio orgánico.

Es probable, que el efecto de disolvente puede ser menor en el caso de otros sustratos con peores grupos salientes, tales como DPP o dimetilfosfato.⁽⁴⁵⁾ En este caso, la selección de sustratos con el mismo grupo saliente nos permitió restringir la cantidad de parámetros que afectan a la constante de velocidad de la hidrólisis, ya que la salida de nitrofenolato en todos los casos se rige por los mismos parámetros de la reacción y por lo tanto el efecto de grupo saliente puede no tomarse en consideración en los estudios comparativos de los tres sustratos.

Capítulo 7.

Hidrólisis catalítica de los sustratos en agua

Se estudió a fondo el efecto catalítico de metales alcalinotérreos sobre los sustratos en agua. Los experimentos se llevaron a cabo a diferentes temperaturas. En estos casos las constantes de autoionización de agua y de formación de especies activas varían. Para calcular correctamente las constantes catalíticas asociadas a cada hidroxocomplejo, es necesario conocer las constantes de formación de éstos para cada temperatura a la que se efectuó la reacción. Como referencia, se tomaron los valores de constantes de formación y parámetros termodinámicos de la literatura⁽²⁰⁾ y se calcularon las constantes de interés a las temperaturas empleadas (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Valores calculados de constantes de autoionización de agua y de formación de monohidroxocomplejos metálicos a las temperaturas empleadas en los experimentos cinéticos. El renglón a 25°C representa valores experimentales de la literatura.⁽²⁰⁾

T°C	Log K _w	K _{MgOH+}	K _{CaOH+}	K _{SrOH+}
17	-14.05	437.05	18.18	5.96
25	-13.78	380.18	19.95	6.31
27	-13.71	367.59	20.40	6.39
31	-13.58	344.10	21.32	6.56
37	-13.39	312.64	22.73	6.82
42	-13.24	289.44	23.93	7.03
45	-13.15	276.68	24.66	7.16
47	-13.09	268.61	25.15	7.25
54	-12.90	242.87	26.89	7.55

En las reacciones estudiadas se han calculado las constantes observadas de primer orden a partir de las ecuaciones cinéticas correspondientes (Ecuaciones 4.1 y 4.2). En el caso de reacciones con Mg²⁺ para prevenir la precipitación del hidróxido del metal insoluble se utilizó pH constante, fijado con una disolución amortiguadora de TRIS. En este caso a partir de los valores de pH medidos y la constante de autoionización del agua se determinó la concentración de OH⁻ libre. En el caso de Mg²⁺ la concentración de la especie activa MOH⁺ se obtuvo a partir de las constantes de formación correspondientes, utilizando la ecuación 7.1.

$$[MOH^+] = \frac{[M]_T \times [OH^-] \times K_{MOH}}{1 + [OH^-] \times K_{MOH}} \quad (7.1)$$

La constante catalítica de interés es la pendiente en la relación lineal entre los valores de las constantes observadas en función de la concentración de $[MOH^+]$. En el caso de las reacciones de Ca^{2+} y Sr^{2+} donde se adiciona la concentración conocida de la base a una concentración conocida del metal, se conocen sólo las concentraciones totales de los reactivos. Sin embargo, la concentración de la especie presente en el exceso puede considerarse igual a su concentración libre. En este caso, a partir de la constante observada y las concentraciones correspondientes del metal e hidróxido totales, se obtiene una constante de tercer orden k_3 . A partir de ésta se genera una constante catalítica de segundo orden, de acuerdo a la expresión 7.2.

$$k_2 = k_3 \frac{1 + [OH^-]_T \times K_{MOH}}{K_{MOH}} \quad (7.2)$$

Donde $[OH^-]_T$ es la concentración total de la especie en exceso. En algunos experimentos se utiliza un exceso del ion metálico sobre el hidróxido. En estos casos se aplica la misma ecuación, donde $[OH^-]_T$ esta sustituida por $[M^{2+}]_T$. Las constantes catalíticas calculadas se promedian y de esta manera se informan para todas los sistemas al final del capítulo.

7.1 Hidrólisis de BNPP

7.1.1 Hidrólisis en presencia de iones Mg^{2+}

El dihidroxocomplejo $Mg(OH)_2$ tiene muy baja solubilidad en agua (Tabla 2.4), forma geles a $pH > 10$, lo que dificulta el trabajo con este metal. Descubrimos que la presencia de TRIS a partir de 0.01 M es suficiente para prevenir su precipitación y así llevar a cabo la reacción. Esto nos permitió trabajar en el intervalo de pH de 8.5 a 10.5,

con un rango amplio de concentraciones de Mg^{2+} . El pH del buffer se ajustaba con el ácido perclórico.

El pH de las muestras se midió al inicio de la reacción a temperatura ambiente ($20^{\circ}C$) y después la temperatura de las celdas con disolución fue llevada a $37^{\circ}C$. El cambio de la constante de disociación de agua se estimaba a partir de los datos en la tabla 7.1. El cambio de pH debido a la disociación de TRIS fue determinado a partir de una curva empírica (Figura 7.1), donde una concentración igual de buffer fue neutralizada con $HClO_4$ a $20^{\circ}C$ y a $37^{\circ}C$, obteniendo así una relación lineal útil entre los valores de pH a estas dos temperaturas (Ecuación 7.3).

$$pH_{37C} = 1.16 \times pH_{20C} - 1.72 \quad (7.3)$$

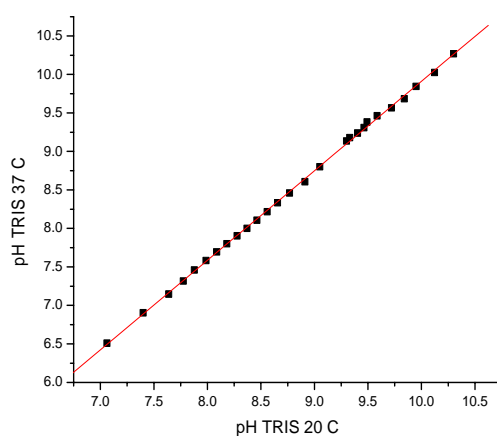


Figura 7.1 La relación empírica entre el pH de TRIS 0.05 M a 20 y $37^{\circ}C$.

El TRIS forma complejos débiles con los metales alcalinotérreos (el logaritmo de la constante de formación oscila entre 1 y 2).⁽⁴⁴⁾ Sin embargo, en el caso de Mg^{2+} la concentración de los complejos metal-ligante se estimó en menos de 10% de la concentración total del metal, por lo que fue despreciada, ya que se consideró que este tratamiento de datos no afectaba de manera significativa la formación de $MgOH^+$.

Para la hidrólisis de BNPP se utilizaron disoluciones de buffer 0.08 M y las concentraciones de metal se variaron en el intervalo de 0-0.06 M. El experimento se llevó a cabo en 4 disoluciones con pH diferente: 9.3, 9.5, 9.7 y 9.9 (20°C). (Tabla 7.2)

Tabla 7.2 Resultados experimentales de la hidrólisis de BNPP 0.5 mM en presencia de 0.08 M de TRIS a 4 pH diferentes y la concentración de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ variable a 37°C.

$[\text{Mg}^{2+}]$, M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ pH 9.3	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ pH 9.5	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ pH 9.7	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ pH 9.9
0.01		2.33×10^{-7}	4.01×10^{-7}	4.77×10^{-7}
0.02		3.92×10^{-7}	5.18×10^{-7}	7.58×10^{-7}
0.03	3.14×10^{-7}	4.97×10^{-7}	--	9.86×10^{-7}
0.04	4.94×10^{-7}	6.29×10^{-7}	7.84×10^{-7}	1.13×10^{-6}
0.05	4.36×10^{-7}	6.69×10^{-7}	8.10×10^{-7}	1.25×10^{-6}
0.06	5.20×10^{-7}	7.84×10^{-7}	1.02×10^{-6}	1.62×10^{-6}

Para cada valor de pH se calculó la concentración de $[\text{MOH}^+]$ correspondiente (aquí se han omitido los pasos de cálculo de pH a 37 °C con la fórmula 7.1, cálculo de concentración de OH^- libre y cálculo de la concentración de especie catalítica con la expresión 7.2).

Tabla 7.3. Resultados experimentales de la tabla 7.2 recalculados como función de concentración de $[\text{MgOH}^+]$ a partir de las ecuaciones 7.1 y 7.2.

$[\text{MOH}^+]$, pH 9.3	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ pH 9.3	$[\text{MOH}^+]$, pH 9.5	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ pH 9.5	$[\text{MOH}^+]$, pH 9.7	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ pH 9.7	$[\text{MOH}^+]$, pH 9.9	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ pH 9.9
1.39×10^{-4}	--	2.54×10^{-4}	2.32×10^{-7}	5.78×10^{-4}	4.01×10^{-7}	3.47×10^{-4}	4.77×10^{-7}
3.09×10^{-4}	--	5.49×10^{-4}	3.91×10^{-7}	0.00138	5.18×10^{-7}	7.89×10^{-4}	7.57×10^{-7}
4.64×10^{-4}	3.14×10^{-7}	8.03×10^{-4}	4.97×10^{-7}	0.00197	--	0.00125	9.86×10^{-7}
6.02×10^{-4}	--	0.00107	6.28×10^{-7}	0.00249	7.84×10^{-7}	0.00162	1.13×10^{-6}
7.73×10^{-4}	4.36×10^{-7}	0.00137	6.69×10^{-7}	0.00289	8.10×10^{-7}	0.00202	1.25×10^{-6}
9.53×10^{-4}	5.20×10^{-7}	0.00169	7.84×10^{-7}	0.00393	1.02×10^{-6}	0.00237	1.62×10^{-6}

A partir de los datos de la tabla 7.3 se encontraron dependencias lineales de las constantes observadas como una función de la concentración de la especie activa. Estas constantes son atribuidas al complejo acuoso de $[\text{MgOH}^+]$. Todas las constantes observadas son función de $[\text{MgOH}^+]$ y por lo tanto independientes de la concentración del metal o de hidróxido. Al graficar todos los puntos obtenidos, se obtiene un valor final de $k_2 = (3.58 \pm 0.12) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que se va a considerar en futuras discusiones.

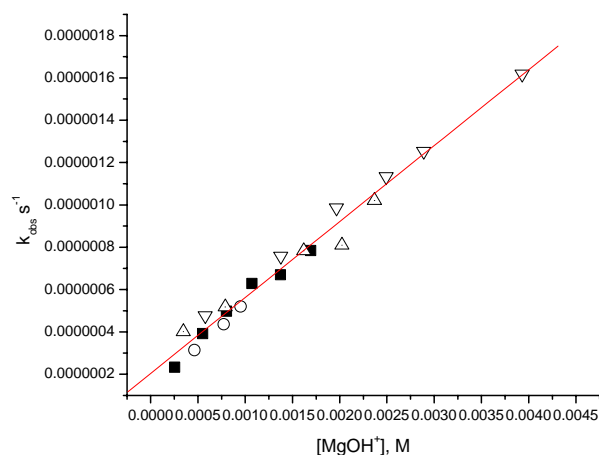


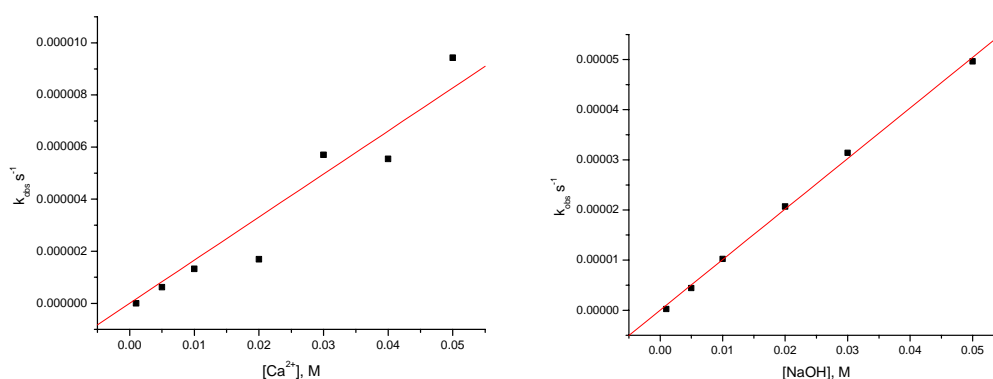
Figura 7.2. Hidrólisis de BNPP en presencia de Mg²⁺ y TRIS 0.08 M a 37°C. Constante catalítica calculada para el experimento. Los cuadrados negros corresponden al pH 9.5, círculos a pH 9.3, triángulos invertidos a 9.7 y triángulos simples a 9.9

7.1.2 Hidrólisis en presencia de iones Ca²⁺

Debido a que la constante de formación de Ca(OH)⁺ es muy baja, es necesario ir a pH elevados para tener una concentración considerable del catalizador. En el presente estudio esto se ha logrado utilizando adiciones de NaOH puro de concentración conocida. Así, la concentración de [Ca²⁺]_T y [OH⁻]_T siempre se mantienen fijas y las constantes catalíticas se determinan utilizando la ecuación 7.2. Para comprobar que el orden de la reacción es 1 para el metal y el hidróxido, se llevaron a cabo dos experimentos diferentes. En el primer caso se estudió la rapidez de la hidrólisis como función de [Ca²⁺]_T y en el segundo caso como función de la base a concentración de metal conocida. Los valores de las constantes obtenidas fueron corregidos por la contribución de la hidrólisis básica en cada caso. Las dependencias lineales indicaron el orden 1 en cada reacción, lo que corrobora que la especie activa en este caso es CaOH⁺. Los experimentos de Ca²⁺ y Sr²⁺ con BNPP se realizaron con fuerza iónica constante igual a 0.2 M, impuesta por LiClO₄

Tabla 7.5. Hidrólisis de BNPP en presencia de iones Ca²⁺ en agua a 37 °C, resultados de ajustes a velocidades iniciales. En la reacción con Ca(ClO₄)₂ variable : BNPP 1 mM, NaOH 10 mM; en la reacción de NaOH variable: BNPP 1 mM, Ca(ClO₄)₂ 5 mM

Ca ²⁺ , mM	k _{obs} s ⁻¹	k _{obs} s ⁻¹ -k _{OH} [OH ⁻]	NaOH, mM	k _{obs} s ⁻¹	k _{obs} s ⁻¹ -k _{OH} [OH ⁻]
0.001	3.34×10 ⁻⁷	0	0.001	2.67×10 ⁻⁸	0
0.005	9.68×10 ⁻⁷	6.18×10 ⁻⁷	0.005	4.61×10 ⁻⁷	2.75×10 ⁻⁷
0.01	1.67×10 ⁻⁶	1.32×10 ⁻⁶	0.01	1.06×10 ⁻⁶	6.89×10 ⁻⁷
0.02	2.04×10 ⁻⁶	1.69×10 ⁻⁶	0.02	2.14×10 ⁻⁶	1.40×10 ⁻⁶
0.03	6.05×10 ⁻⁶	5.7×10 ⁻⁶	0.03	3.25×10 ⁻⁶	2.14×10 ⁻⁶
0.04	5.89×10 ⁻⁶	5.54×10 ⁻⁶	0.05	5.15×10 ⁻⁶	3.29×10 ⁻⁶
0.05	9.78×10 ⁻⁶	9.43×10 ⁻⁶	0.075	7.07×10 ⁻⁶	4.30×10 ⁻⁶



Figuras 7.3 Resultados de la tabla 7.5. Los ajustes lineales tienen pendientes iguales a 0.000101 M⁻¹ s⁻¹ para NaOH variable y 0.000164 M⁻¹ s⁻¹ para Ca²⁺ variable

El valor de la constante catalítica de segundo orden se calculó con la ecuación 7.2 utilizando la constante de formación de la literatura. Para el caso de Ca²⁺ variable, la pendiente es la dependencia de las constantes de velocidad observadas como función de metal fue de 1.64×10⁻⁴ M⁻¹ s⁻¹. La constante de tercer orden obtenida al dividir el valor anterior entre la concentración de la base que se mantenía fija es de 1.64×10⁻² M⁻² s⁻¹. La constante catalítica de segundo orden es calculada con la ecuación 7.2 y fue de 0.000882 M⁻¹ s⁻¹.

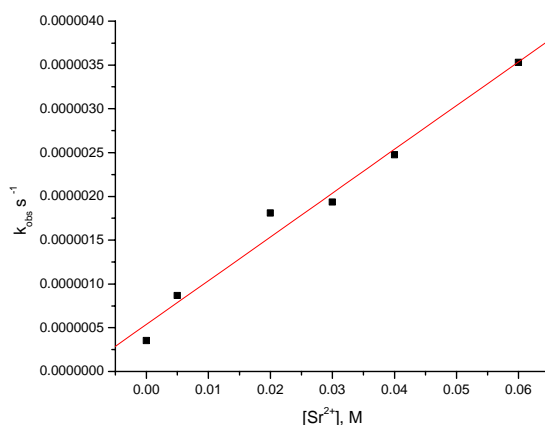
Para el caso de NaOH variable se tiene: pendiente en ajuste a puntos iniciales 1.01×10⁻⁴ M⁻¹ s⁻¹, constante de tercer orden 2.02 ×10⁻² M⁻² s⁻¹ y una constante final de segundo orden, empleando para ello un ajuste tipo Michaelis- Menten (ecuación 7.3), el valor es de 0.000991 M⁻¹ s⁻¹. En las futuras discusiones se utilizó el valor promedio de 0.000936 M⁻¹ s⁻¹

7.1.3 Hidrólisis en presencia de iones Sr^{2+}

Se llevaron a cabo 2 tipos de experimentos con Sr^{2+} variable. Debido al alto valor de pK_a de Sr^{2+} , la especie $SrOH^+$ se forma en concentraciones considerables sólo a un pH muy elevado. A las concentraciones de Sr^{2+} y OH^- empleadas en este trabajo la cantidad de $SrOH^+$ formado todavía es pequeña, lo que indica una baja contribución de Sr^{2+} a la constante de la actividad. No es posible elevar estas concentraciones debido a la formación de $Sr(OH)_2$ insoluble a hidróxido y del metal mas concentrados. Para los cálculos de constantes de velocidad se utilizó el ajuste a las velocidades iniciales y los valores de las constantes obtenidas fueron corregidos por la contribución de la hidrólisis básica. En el caso de OH^- variable la contribución de la hidrólisis básica consistía en más de 50 % del valor total observado, por lo cual estos datos no se utilizaron en el cálculo de la constante catalítica.

Tabla 7.6. Hidrólisis de BNPP en presencia de iones Sr^{2+} en agua a 37 °C, resultados de ajustes a velocidades iniciales. En la reacción con $Sr(ClO_4)_2$ variable : BNPP 0.5 mM, NaOH 10 mM; en la reacción de NaOH variable: BNPP 0.5 mM, $Sr(ClO_4)_2$ 5 mM.

Sr^{2+}	$k_{obs} s^{-1}$	$k_{obs} s^{-1} - k_{OH}[OH^-]$	NaOH , mM	$k_{obs} s^{-1}$	$k_{obs} s^{-1} - k_{OH}[OH^-]$
0	3.52×10^{-7}	0	0.005	3.08×10^{-7}	1.23×10^{-7}
0.005	8.68×10^{-7}	4.98×10^{-7}	0.01	1.18×10^{-6}	8.11×10^{-7}
0.02	1.81×10^{-6}	1.44×10^{-6}	0.02	2.08×10^{-6}	1.34×10^{-6}
0.03	1.93×10^{-6}	1.56×10^{-6}	0.03	2.29×10^{-6}	1.18×10^{-6}
0.04	2.47×10^{-6}	2.11×10^{-6}	0.04	2.85×10^{-6}	1.37×10^{-6}
0.06	3.53×10^{-6}	3.16×10^{-6}			



Figuras 7.4 Resultados de la tabla 7.6 para Sr²⁺ variable. El ajuste lineal tiene pendiente igual a $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Para el caso del metal variable, la constante de segundo orden es $5.00 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esto lleva a la constante de tercer orden igual a $5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y la constante catalítica en este caso es igual a $7.83 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

7.1.4 Energía de activación de la reacción de hidrólisis

Para entender mejor el efecto de los metales alcalinotérreos se determinó la energía de activación de la reacción de hidrólisis básica e hidrólisis en presencia de metales. Para el hidróxido libre, Ca²⁺ y Sr²⁺ se utilizaron 6 temperaturas diferentes con las concentraciones totales de hidróxido y del metal conocidas y constantes calculadas a partir de la tabla 7.1 y ecuación 7.3. En el caso de Mg²⁺ las velocidades de reacción se midieron en TRIS a 4 temperaturas diferentes, calculando la concentración del hidróxido libre a partir de la constante de disociación de buffer. Para calcular la energía de activación se utilizó la ecuación 7.4⁽⁵²⁾

$$k_2 = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (7.4)$$

Para encontrar la energía de activación de la hidrólisis de BNPP en presencia de Mg²⁺ se utilizaron 4 temperaturas diferentes: 25, 31, 37, 42°C. En cada caso se realizaron series a 5 pH diferentes con metal 0.05 M, TRIS 0.08M y BNPP 5×10^{-4} M. Los valores

de pH fueron medidos a 20 °C y extrapolados a la temperatura de la reacción correspondiente. Para ésto se desarrolló la ecuación empírica 7.5, que utilizó la ecuación de Henderson-Hasselbach, y los valores de las constantes de acidez conocidas a 37°C y 20°C.

$$pH_i = pH_{20} + \frac{0.434E_a}{R} \left(\frac{1}{T_i} - \frac{1}{293.15} \right) = pH_{20} + 802 \left(\frac{1}{T_i} - \frac{1}{293.15} \right) \quad (7.5)$$

A partir de aquí se calculó la concentración de hidróxido libre, utilizando las constantes de disociación de agua a la temperatura del experimento (datos en la Tabla 7.1). Las concentraciones de $MgOH^+$ se determinaron como se describe en el capítulo 7.1.1.

Tabla 7.7 Resultados de la medición de la energía de activación de BNPP hidrolizado por Mg^{2+} 0.05 M en TRIS 0.08 M a 4 temperaturas diferentes. Se presentan pH medidos a 20°C y las concentraciones calculadas de $[MgOH^+]$, omitiendo el calculo de pH correspondiente a cada temperatura con la formula 7.5.

42°C			37°C		
pH	$[MgOH^+]$	$k_{obs} s^{-1}$	pH	$[MgOH^+]$	$k_{obs} s^{-1}$
9.69	1.87×10^{-4}	2.59×10^{-6}	9.3	4.76×10^{-5}	4.36×10^{-7}
9.49	1.18×10^{-4}	1.52×10^{-6}	9.5	8.1×10^{-5}	6.69×10^{-7}
9.31	7.80×10^{-5}	1.14×10^{-6}	9.7	1.38×10^{-4}	8.10×10^{-7}
9.19	5.92×10^{-5}	8.11×10^{-7}	9.9	2.36×10^{-4}	1.53×10^{-6}
8.94	3.33×10^{-5}	6.68×10^{-7}			
31°C			25°C		
pH	$[MgOH^+]$	$k_{obs} s^{-1}$	pH	$[MgOH^+]$	$k_{obs} s^{-1}$
9.79	1.34×10^{-4}	6.06×10^{-7}	9.85	1.10×10^{-4}	2.53×10^{-7}
9.62	9.07×10^{-5}	4.57×10^{-7}	9.67	7.29×10^{-5}	1.44×10^{-7}
9.48	6.57×10^{-5}	2.71×10^{-7}	9.52	5.16×10^{-5}	1.00×10^{-7}
9.34	4.76×10^{-5}	2.73×10^{-7}	9.39	3.82×10^{-5}	5.45×10^{-8}
9.03	2.33×10^{-5}	9.66×10^{-8}	9.16	2.25×10^{-5}	9.59×10^{-9}

Se calcularon las constantes catalíticas de segundo orden en cada caso. La energía de activación se determinó a partir de estos valores, empleando la expresión 7.4 (Figura 7.5). Los resultados se presentan en la tabla 7.9.

En el caso del resto de los sistemas, se ha llevado a cabo un estudio a 6 temperaturas diferentes: 17, 27, 37, 45, 47 y 54 °C con metal 10mM y NaOH 50 mM. Las constantes catalíticas de segundo orden fueron calculadas en cada caso a partir de los valores conocidos de las constantes de formación de las especies activas y las concentraciones totales del metal e hidróxido, considerando la concentración de hidróxido, que está dada en exceso, igual a la concentración de hidróxido libre constante.

Tabla 7.8 Resultados de la medición de la hidrólisis de BNPP (constantes catalíticas de segundo orden) con hidróxido, Ca²⁺ y Sr²⁺ a 6 temperaturas diferentes con la concentración de hidróxido igual a 50 mM, metal 10 mM y BNPP 1 mM. Las constantes catalíticas de segundo orden se calcularon con la ecuación 7.2

T°C	k _{OH} M ⁻¹ s ⁻¹	Ca ²⁺ k ₂ M ⁻¹ s ⁻¹	Sr ²⁺ k ₂ M ⁻¹ s ⁻¹
17	2.45×10 ⁻⁶	5.47×10 ⁻⁴	1.12×10 ⁻⁴
27	9.21×10 ⁻⁶	0.0011	4.71×10 ⁻⁴
37	2.88×10 ⁻⁵	0.0016	7.20×10 ⁻⁴
45	6.02×10 ⁻⁵	0.003	0.00214
47	3.63×10 ⁻⁴	0.0076	0.00242
54	3.71×10 ⁻⁴	0.013	0.00545

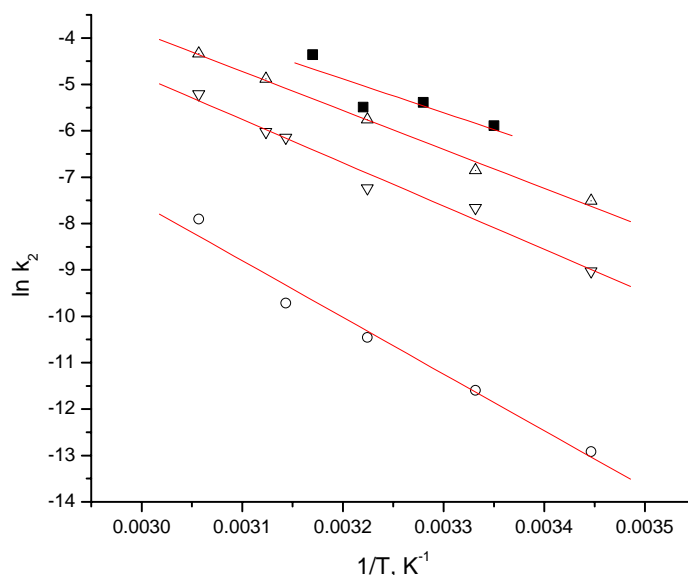


Figura 7.5 Cálculo de la energía de activación para la hidrólisis básica (círculos) y hidrólisis básica catalizada con metales alcalinotérreos (cuadrados para Mg²⁺, triángulos hacia arriba para Ca²⁺ y triángulos invertidos para Sr²⁺) de BNPP.

Tabla 7.9. Resultados energía de activación.

	Ea, kJ/mol	ln A
OH ⁻	101.6±8.81	29.08±3.46
Mg ²⁺	71.1±3.06	22.75±1.2
Ca ²⁺	69.8±3.4	21.31±1.34
Sr ²⁺	77.6±2.13	23.19±2.17

Los tres metales disminuyen la energía de activación del BNPP con un valor muy cercano entre si. Esto hace suponer que los tres llevan un mismo mecanismo de reacción; donde el ion metálico disminuye la energía de activación de la reacción debido a la estabilización electrostática del estado de transición.

7.2 Hidrólisis de HPNPP

El sustrato HpNPP es más reactivo que el BNPP, por lo cual, fue posible llevar a cabo todas las reacciones a pH mas bajo, controlado por el buffer TRIS. En todos los casos se utilizó buffer 0.05 M ajustado a diferente pH con HClO₄ a 20°C. El pH a 37°C fue recalculado con la fórmula 7.1.

Se llevaron a cabo dos experimentos. En el primer caso se estudió la actividad catalítica a pH constante y en el segundo caso el pH variaba a una concentración óptima del metal obtenida de los resultados del primer experimento. En ambos casos las dependencias de las concentraciones de especies variables fueron lineales, lo que según la ley de Oswald indica la reacción de primer orden con respecto al metal y al hidróxido.

Tabla 7.10. Resultados experimentales de hidrólisis acuosa de HpNPP con metales alcalinotérreos a pH 10 (20°C), 0.05M de TRIS, 0.05 mM de HpNPP y concentraciones de metal variables a 37°C

[M ²⁺], M	[MgOH ⁺], M	k _{obs} s ⁻¹	[CaOH ⁺], M	k _{obs} s ⁻¹	[SrOH ⁺], M	k _{obs} s ⁻¹
0	0	1.03×10 ⁻⁵	0	1.17×10 ⁻⁵	0	1.13×10 ⁻⁵
1E-3	1.46×10 ⁻⁴	1.6×10 ⁻⁴	1.14×10 ⁻⁵	6.00×10 ⁻⁵	5.41×10 ⁻⁵	5.1×10 ⁻⁵
0.003	3.99×10 ⁻⁴	4.6×10 ⁻⁴	3.23×10 ⁻⁵	1.30×10 ⁻⁴	4.95×10 ⁻⁵	1.87×10 ⁻⁴
0.005	6.98×10 ⁻⁴	6.0×10 ⁻⁴	4.53×10 ⁻⁵	1.90×10 ⁻⁴	5.26×10 ⁻⁵	1.53×10 ⁻⁴
0.01	0.00113	9.1×10 ⁻⁴	1.03×10 ⁻⁴	2.80×10 ⁻⁴	1.02×10 ⁻⁴	2.38×10 ⁻⁴

Para los experimentos de pH variable se seleccionó una concentración de la solución del metal 5 mM en cada caso. En este caso la hidrólisis básica del sustrato constituye menos del 5% del valor de constante observada, por lo que su contribución es despreciable.

Tabla 7.11 Resultados experimentales de la hidrólisis acuosa de HpNPP como función de pH a 5 mM de metal, 0.05 M de TRIS y 0.05 mM de HpNPP con valores de pH recalculados a 37°C.

pH Mg ²⁺	k _{obs} s ⁻¹	pH Ca ²⁺	k _{obs} s ⁻¹	pH Sr ²⁺	k _{obs} s ⁻¹
9.92	3.1×10 ⁻⁴	9.67	1.1×10 ⁻⁴	10.19	4.74×10 ⁻⁵
9.65	2.0×10 ⁻⁴	9.51	9.0×10 ⁻⁵	10.02	3.06×10 ⁻⁵
9.48	1.4×10 ⁻⁴	9.33	7.0×10 ⁻⁵	9.91	2.91×10 ⁻⁵
9.36	1.2×10 ⁻⁴	9.05	5.0×10 ⁻⁵	9.80	2.13×10 ⁻⁵
9.25	9.0×10 ⁻⁵	8.86	2.0×10 ⁻⁵	9.73	2.06×10 ⁻⁵
				9.55	1.49×10 ⁻⁵
				9.47	1.19×10 ⁻⁵
				9.31	7.79×10 ⁻⁶
				9.50	9.05×10 ⁻⁶
				9.15	7.14×10 ⁻⁶
				8.90	4.46×10 ⁻⁶
				8.72	3.48×10 ⁻⁶

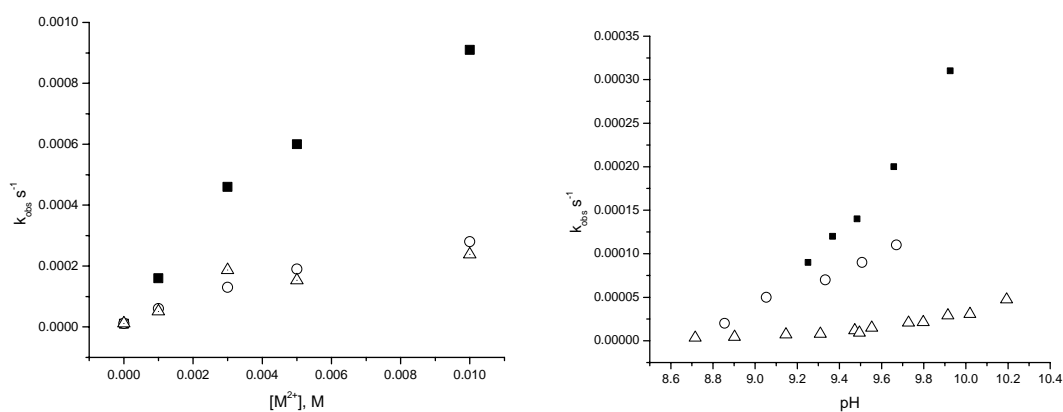


Figura 7.6. Hidrólisis de HpNPP en presencia de concentración variable de metales alcalinotérreos y concentración de metales fija (5 mM) y pH variable (Mg²⁺ cuadrados negros, Ca²⁺ círculos, Sr²⁺ triángulos)

La constante catalítica de segundo orden se determinó en cada experimento a partir de la relación lineal entre k_{obs} y la concentración de $[\text{MOH}^+]$ y los valores obtenidos se reportan en la tabla 7.12. El análisis mas detallado de estos resultados se presentará al final del capítulo.

Tabla 7.12. Resultados de la hidrólisis de HpNPP

Metal	$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}, \text{OH}^-$ variable	$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}, \text{M}^{2+}$ variable	$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, promedio
Sr^{2+}	2.12	2.18	2.15 ± 0.03
Ca^{2+}	3.76	2.55	3.16 ± 0.60
Mg^{2+}	0.58	0.78	0.68 ± 0.1

7.3 Hidrólisis de PNPDP

La hidrólisis del triéster fosfato fue imposible de llevar a cabo en agua debido a problemas de solubilidad del sustrato. Por otra parte, el uso de un 10 % de CH_3CN causó problemas con la precipitación de hidróxidos de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Los resultados con estos dos metales presentaron una gran dispersión de datos sin ninguna dependencia visible, por lo cual, se puede suponer que estos iones metálicos son inactivos como catalizadores. Los resultados de la hidrólisis del triéster en presencia de iones Sr^{2+} fueron más fáciles de interpretar. Para este sistema se observó una ligera inhibición de la velocidad de hidrólisis en presencia de los iones metálicos. Esta inhibición presenta una saturación. El ajuste tipo Michaelis-Menten revela que la constante de saturación es 2.79 M^{-1} lo que se parece mucho a la constante de formación de la especie SrOH^+ informada en la literatura e igual a 6.82 M^{-1} . Se puede suponer que el OH^- libre en este caso es mejor nucleófilo que el hidróxido coordinado al metal. Probablemente, el papel principal del metal es la activación de nucleófilo que no interfiere en la rapidez de la reacción debido a la presencia de una cantidad considerable de esta especie libre. El triéster no posee ninguna carga negativa a la que pudiera unirse el ion metálico, además de que es un ligante pobre. El mecanismo de estabilización del intermediario mediante un ciclo de cuatro miembros propuesto por algunos autores⁽⁶⁾ es poco probable ya que este ion metálico es un ligante débil para establecer ciclos tan tensos y termodinámicamente desfavorables. En este sistema el único papel del ion metálico es el consumo de hidróxido libre que lleva a una disminución de la velocidad de la reacción.

Sr ²⁺ , M	k _{obs} s ⁻¹
0	0.00192
0.005	0.00186
0.01	0.00181
0.05	0.00155
0.1	0.00123

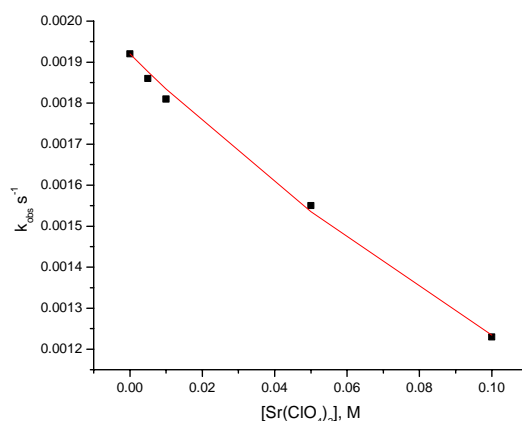


Tabla 7.13 y Figura 7.7. Hidrólisis de PNPDP en presencia de NaOH 1 mM y iones Sr²⁺ a concentración variable.

Una dificultad más en la interpretación de los resultados para PNPDP es la presencia de una alta concentración de disolvente orgánico. El disolvente afecta los equilibrios ácido-base de las sales metálicas. El efecto de la fuerza iónica creado por la presencia de la sal es diferente y más fuerte que para los sistemas acuosos puros. Por lo tanto, el efecto catalítico de la sal es muy difícil de predecir.

7.4 Conclusiones sobre la hidrólisis catalítica en agua

Todos los resultados relacionados con la hidrólisis de sustratos en agua, están incluidos en la tabla 7.14.

Tabla 7.14. Constantes de velocidad de la hidrólisis de los sustratos en agua por diferentes hidroxio especies.

Especie activa	k ₂ M ⁻¹ s ⁻¹ BNPP	k ₂ M ⁻¹ s ⁻¹ HpNPP	k ₂ M ⁻¹ s ⁻¹ PNPDPP
OH ⁻	3.7×10 ⁻⁵	0.0987	1.22
Mg(OH) ⁺	3.58×10 ⁻⁴	0.68395	-
Ca(OH) ⁺	9.36×10 ⁻⁴	3.14365	-
Sr(OH) ⁺	8.9×10 ⁻⁴	2.15	1.22

Como se puede observar, los metales alcalinotérreos son catalizadores débiles de hidrólisis de triésteres fosfato. Es un resultado esperado ya que las enzimas fosfotriesterasas sólo funcionan con Zn^{2+} y también es el ion con el cual se observa actividad catalítica en sistemas artificiales. Parece que los metales alcalinotérreos no pueden estabilizar el estado de transición cíclico de cuatro miembros requerido para este tipo de catálisis con un sustrato neutro que no interactuó significativamente con el ion metálico. Por lo tanto, los iones metálicos sólo participan en la formación de las partículas MOH^+ . Este tipo de efecto catalítico se observa con los iones lantánidos y algunos metales de transición con bajos valores de pK_a . Sin embargo, debido a los valores bajos de constantes de formación para metales alcalinotérreos los hidroxocomplejos sólo se forman a valores muy altos de pH, donde ya existen cantidades considerables del nucleófilo libre que lleva a cabo esta reacción de una manera mucho más eficiente.

En el caso de los diésteres fosfato se observa un bajo efecto catalítico, con el aumento de la constante catalítica comparado con la hidrólisis básica de 5 a 50 veces para los dos sustratos. Ambos se hidrolizan de manera más eficiente con Ca^{2+} . Curiosamente, en esta situación se repiten los resultados observados para metaloenzimas mononucleares. ⁽¹²⁾ El sistema descrito también es mononuclear, ya que no se han informado los conglomerados de metales alcalinotérreos en agua a concentraciones bajas, como son las utilizadas en el presente experimento.

Se calculó la eficiencia de los iones metálicos a pH bajo. Para esto, las constantes catalíticas obtenidas se multiplican por las constantes de formación de las especies, obteniendo así una constante de tercer orden, que esta dada como una función de las concentraciones del metal e hidróxido.

La constante de unión al estado de transición para metales alcalinotérreos se puede determinar a partir del efecto catalítico del metal según la expresión siguiente: ⁽⁴⁾

$$\log K^\ddagger = \log \frac{k_{MOH}}{k_{OH}} + \log K_{OH} = \log \frac{k_3}{k_{OH}} \quad (7.6)$$

Estos valores se presentan en la tabla 7.15. Los valores de las constantes de unión al estado de transición van disminuyendo de Mg^{2+} a Sr^{2+} . Como se puede observar, $\log K^\ddagger$ para los metales alcalinotérreos casi no varía de un sustrato a otro para el ion Mg^{2+} , mientras que la variación es de 30% para el ion Sr^{2+} .

El estado de transición de la hidrólisis de diésteres fosfato propuesto en la actualidad es un fosforano dianiónico. Los dianiones de monoésteres fosfato con frecuencia se consideran como un modelo del estado de transición.^(4,8) Los valores de $\log K$ para los complejos de los cationes con un monoéster fosfato $ROPO_3^{2-}$ están presentes en la última columna de la Tabla 7.15. El ácido conjugado de $ROPO_3^{2-}$ tiene un pK_a igual a 8.3, que es el mismo que el pK_a del estado de transición para la hidrólisis no-catalítica de BNPP.⁽⁴⁾ Los valores de $\log K$ para este monoéster fueron calculados empleando las correlaciones del tipo Brønsted para $\log K$ de complejos metálicos con los monoésteres fosfato presentados en este trabajo.⁽⁵⁹⁾

Tabla 7.15. Constantes de velocidad de tercer orden y el logaritmo de la constante de unión de iones metálicos al estado de transición para diésteres fosfato.

Metal	$k_3, M^{-2}s^{-1}$		$\log K^\ddagger$		$\log K^a$
	BNPP	HpNPP	BNPP	HpNPP	$ROPO_3^{2-}$
Mg^{2+}	0.111	311.92	3.48	3.50	2.26
Ca^{2+}	0.0265	19.58	2.85	2.30	2.03
Sr^{2+}	0.00607	5.12	2.21	1.71	1.65

^{a)} Constante de estabilidad calculada para un dianión del monoéster fosfato con pK_a del ácido conjugado 8.3⁽⁵⁹⁾

En nuestros resultados, los valores de $\log K^\ddagger$ siguen la misma tendencia que el logaritmo de la constante de formación de complejos de metales alcalinotérreos con el modelo del estado de transición, además de que los valores absolutos de las constantes de ambas series son cercanos en el orden de magnitud, lo que indica que el efecto catalítico observado en este sistema es razonable. Sorprendentemente, a pesar de la gran discrepancia en las constantes de segundo orden para BNPP y HpNPP, las constantes de

unión de iones metálicos a los estados de transición de ambos sustratos son semejantes, lo que podría indicar semejanzas estructurales de los estados de transición en este sistema (Figura 7.8).

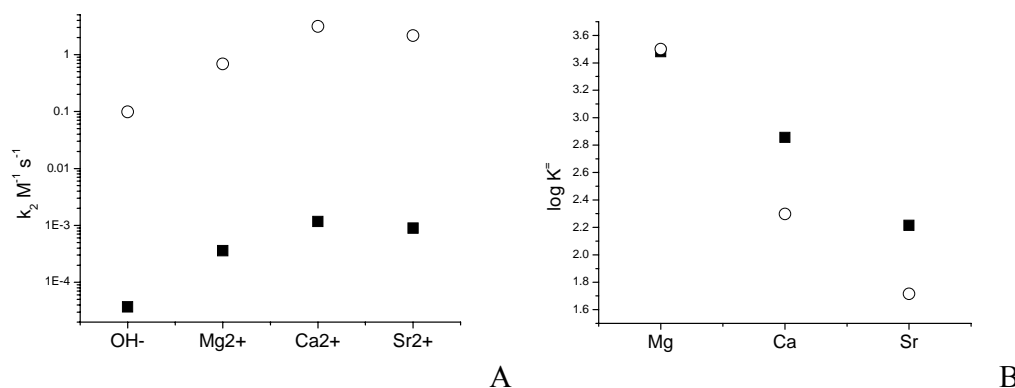


Figura 7.8 Cambio de la constante de velocidad de la hidrólisis (A) y de la constante de unión al estado de transición (B) para diésteres fosfato y iones de metales alcalinotérreos. Cuadrados – BNPP, círculos – HpNPP.

La constante de unión de los metales (A) y ligantes (B) en química de coordinación depende de los factores estéricos (D), covalentes (C) y electrostáticos (E), según siguiente fórmula⁽⁵⁸⁾

$$\log K = E_A E_B + C_A C_B - D_A D_B \quad (7.7)$$

Estos parámetros son conocidos para los metales alcalinotérreos y están resumidos en la siguiente tabla.

Tabla 7.16 Factores que rigen la unión de los metales alcalinotérreos a otros ligantes en agua.⁽⁵⁸⁾

Catión	$r_i, \text{Å}$	E_A	C_A	D_A
Mg^{2+}	0.86	1.86	0.178	1.5
Ca^{2+}	1.14	0.98	0.081	0
Sr^{2+}	1.32	0.6	0.057	0

Considerando que el estado de transición no cambia de un metal a otro (como lo indican los resultados de la medición de la energía de activación), las características de BNPP tienen que ser iguales para todos los iones metálicos. Lo mismo ocurre con las características de HpNPP. El mayor cambio de la constante K^\ddagger al pasar de Mg^{2+} a Sr^{2+}

indica que las contribuciones covalente y electrostática de la ecuación 7.7 y la tabla 7.16 son mayores en caso de HpNPP. Debido a los pocos puntos que se tienen para el análisis es imposible crear una correlación multiparamétrica con la ecuación 7.7. Sin embargo, se puede observar en la figura 7.9 que el $\log K^{\ddagger}_{\text{HpNPP}}$ depende de una manera prácticamente lineal de las contribuciones electrostáticas de iones metálicos ($R=0.9997$), mientras que en el caso de BNPP el valor de la constante de Mg^{2+} es menor que el esperado en una correlación lineal, lo que indica una contribución de efecto estérico D para BNPP y este ion. Es poco probable que la contribución covalente de los iones metálicos afecte seriamente la constante de formación del complejo con el estado de transición de los sustratos.

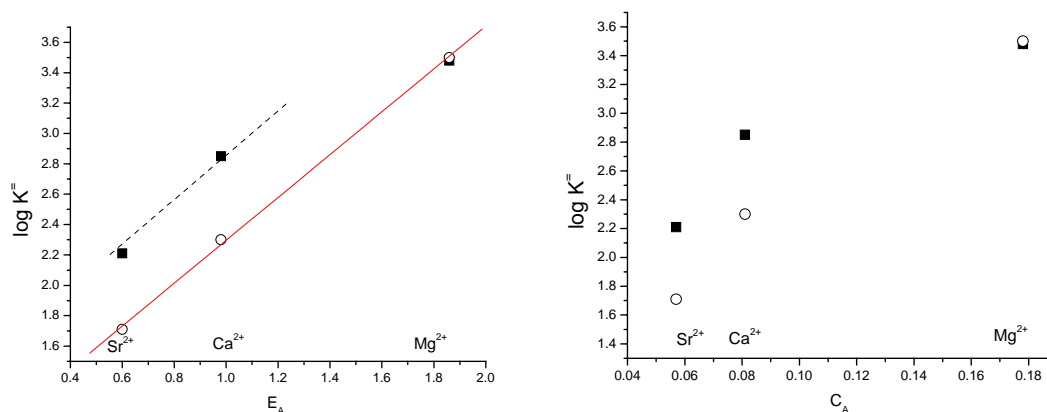


Figura 7.9 La interacción de metales alcalinotérreos con el estado de transición de HpNPP (círculos abiertos) parece ser principalmente de naturaleza electrostática, mientras que para BNPP (cuadrados negros) posiblemente existe una fuerte contribución de efecto estérico para Mg^{2+}

Los resultados explican por qué la constante de unión al estado de transición es máxima para Mg^{2+} - este ion posee mayor densidad de carga y por lo tanto provee una mayor contribución electrostática a la constante de unión y al estado de transición. Por otra parte explica parcialmente el efecto de disolvente. Si la contribución principal a la constante de unión del metal al estado de transición es electrostática, el valor de la constante puede ser modificado al cambiar la permitividad dieléctrica del medio, como ocurre en el caso del cambio de disolvente.⁽³⁰⁾

Capítulo 8

Hidrólisis catalítica de sustratos en DMSO 90%

Al cambiar el disolvente de agua a DMSO 90% v/v los valores de las constantes de formación de especies activas aumentan. Esto lleva al aumento de sus concentraciones, y por lo tanto, k_{obs} . Por otra parte existen factores relacionados con el cambio de disolvente. Entre ellos, la repulsión más fuerte entre las cargas de mismo signo, estabilización o desestabilización de los reactivos, posibles cambios en la geometría de estado de transición. Para evaluar los cambios y proponer un mecanismo razonable de hidrólisis en este medio, se llevó a cabo un estudio cinético detallado para todos los sustratos en DMSO 90%.

8.1 Hidrólisis de PNPDP

La hidrólisis de triésteres fosfato posee el mecanismo más simple. En este caso el metal es responsable de la activación del nucleófilo. La especie catalítica en este caso es $M(\text{OH})_n^{2-n}$, y la rapidez de la reacción dependerá de la nucleofilia del OH^- coordinado al metal – así, mientras más fuerte es el metal como ácido Lewis, más débil será la nucleofilia de hidróxido unido a él. Esta es la tendencia que se observa al llevar a cabo la hidrólisis de PNPDP en presencia de diferentes concentraciones del metal. En todos los casos se registró la disminución de la velocidad de la reacción que es muy brusca para el Mg^{2+} - el ácido Lewis más fuerte, y más débil para el ion Sr^{2+} .

A primera vista puede parecer que los iones metálicos inhiben fuertemente la reacción como se observa para la hidrólisis de PNPDP en agua. Los iones metálicos consumen hidróxido libre del medio de la reacción, disminuyendo la concentración de nucleófilo. Así, cuando la concentración del metal es menor que la concentración de hidróxido, la disminución del valor de la constante observada en todos los casos correlaciona muy bien con la disminución de la concentración de hidróxido.

Tabla 8.1. Hidrólisis de PNPDP en presencia de metales alcalinotérreos en DMSO 90% utilizando 1 mM de Bu₄NOH, 0.02 mM de PNPDP y concentración de M(ClO₄)₂ variable en todos los casos.

[M ²⁺], M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}, \text{Mg}^{2+}$	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}, \text{Ca}^{2+}$	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}, \text{Sr}^{2+}$
0	0.028	0.02806	0.028
1E-4	0.01396	0.02166	0.01906
2E-4	0.00795	0.01335	0.00586
3E-4	0.00477	0.0069	0.01086
4E-4	0.00259	0.00312	0.00357
5E-4	7.27E-6	4.135E-5	0.00405
7E-4	9.28E-6	1.079E-4	0.0054
1E-3	1.26E-5	1.052E-4	0.00546
0.0015			0.00653
0.002	9.79E-6	1.38E-4	0.00865
0.003	1.12E-5	1.58E-4	0.00872
0.004	8.58E-6	2.25E-4	0.01036
0.005		7.81E-5	0.01259

La figura 8.1 muestra el perfil de la constante de velocidad observada vs. concentración total del Mg²⁺ a una concentración fija de Bu₄NOH sobrepuesto con el perfil de la concentración del OH⁻ libre. Un perfil similar se observa en el caso de Ca²⁺. Sin embargo, con Sr²⁺ la velocidad inicialmente decae, pero después de pasar por un mínimo correspondiente a la relación metal:hidróxido 2:5, nuevamente aumenta (Figura 8.2). En la misma figura se muestran curvas de distribución calculadas para diferentes hidroxocomplejos de Sr²⁺. Aparentemente, el aumento de la velocidad significa la existencia de una reactividad notable de hidroxocomplejos de Sr²⁺ con relación metal:hidróxido 1:1 y 2:1 que predominan al exceso del metal sobre hidróxido.

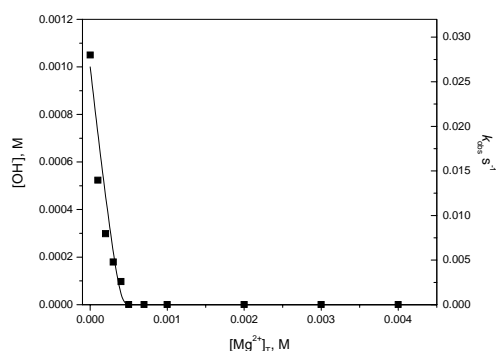


Figura 8.1 Correlación entre la concentración de hidróxido libre (línea) y la velocidad de la reacción en la hidrólisis de PNPDP (cuadrados) con Mg²⁺ en presencia de 1 mM de Bu₄NOH.

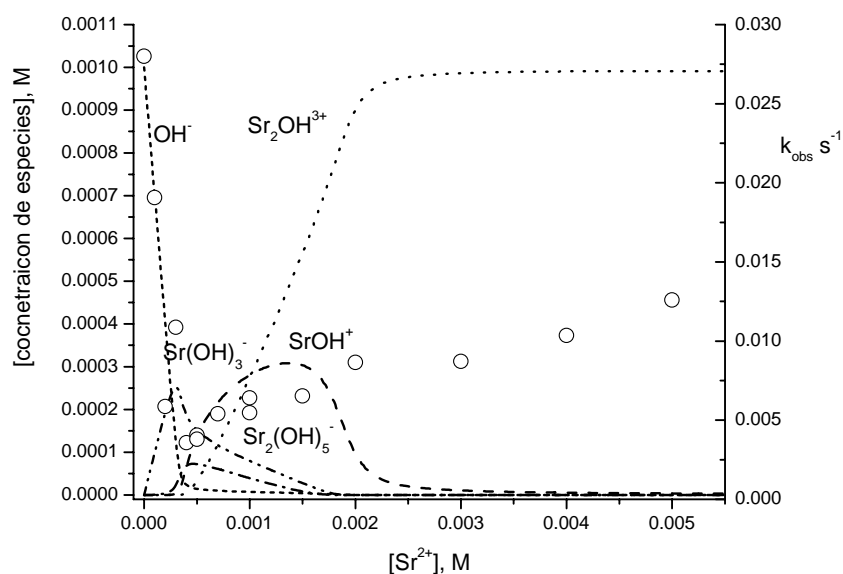


Figura 8.2 Correlación entre la velocidad de la reacción (círculos) y las concentraciones de hidróxido libre y hidroxocomplejos de Sr^{2+} (líneas) en la hidrólisis de PNPDP con Sr^{2+} en presencia de 1 mM de Bu_4NOH .

Un análisis más detallado de los resultados con Mg^{2+} y Ca^{2+} indica que para hidroxocomplejos de estos cationes también existe cierta reactividad diferente de cero. Con el exceso del catión metálico la concentración del OH^- libre cae hasta $10^{-11} - 10^{-12}$ M – un nivel muy bajo que corresponde a la constante de velocidad observada de la hidrólisis alcalina de PNPDP del orden de magnitud de $10^{-10} s^{-1}$, mientras que las constantes experimentales son del orden de $10^{-5} s^{-1}$ para Mg y de $10^{-4} s^{-1}$ para Ca (Tabla 8.1). La ilustración gráfica de esta situación se presenta en la Figura 8.3 donde los resultados de la Tabla 8.1 se muestran en coordenadas semilogarítmicas junto con el perfil de la constante de velocidad de la hidrólisis alcalina observada.

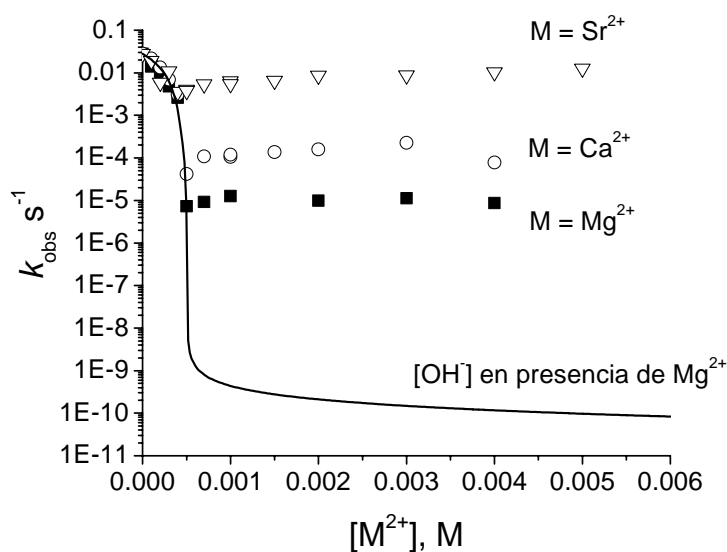


Figura 8.3 Constantes de velocidad de la hidrólisis de PNPDP en presencia de metales alcalinotérreos en coordenadas semilogarítmicas como función de la concentración del metal. La línea sólida representa el valor de la constante observada para la hidrólisis alcalina que se registraría si la hidrólisis se llevara a cabo únicamente con la concentración del hidróxido libre presente a concentraciones dadas de Mg^{2+} .

8.2 Hidrólisis de BNPP

El BNPP es el sustrato mejor estudiado. Se llevaron a cabo las mediciones de la rapidez de la reacción para concentraciones de metal e hidróxido variables. Para calcular las constantes catalíticas, se superpusieron los valores de k_{obs} en el diagrama de distribución de especies a cada concentración correspondiente. Esto permitió encontrar una correlación entre la concentración de la especie responsable por la catálisis y la constante observada y calcular las constantes catalíticas de segundo orden para especies catalíticamente activas. El mecanismo de la hidrólisis de BNPP llevado a cabo por Mg^{2+} es ligeramente diferente a los mecanismos de Ca^{2+} y Sr^{2+} , por lo cual será tratado al final de la sección.

8.2.1. Hidrólisis en presencia de iones Ca^{2+}

A diferencia de la hidrólisis en agua, las constantes observadas de la reacción obtenidas en presencia del ion Ca^{2+} fueron las más bajas entre los tres cationes. Para la variación del hidróxido a concentración del metal constante se utilizó una solución 3 mM de $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ y para la variación del metal a concentración de hidróxido constante se utilizaron 2 mM de hidróxido; en la variación simultánea del metal e hidróxido se mantuvo una relación constante entre ellos igual a 1:1, la concentración de BNPP en todos los casos fue constante e igual a 0.02 mM. Los valores de las constantes observadas fueron encontrados por los ajustes lineales a las velocidades iniciales de la reacción, ocupando la ecuación 4.1 (Tabla 8.2).

Tabla 8.2. Resultados de experimentos con el ion Ca^{2+} . Para la variación de hidróxido se utilizó una solución 3 mM del $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, para la variación del metal se utilizó una solución 2 mM de hidróxido; la concentración de BNPP en todos los casos fue constante e igual a 0.02 mM.

Bu_4NOH , M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	Ca^{2+} , M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\text{Ca}^{2+}:\text{OH}^- = 1:1$, M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$
4.75×10^{-4}	8.76×10^{-6}	0	0	2×10^{-4}	2.86×10^{-7}
0.0019	2.0×10^{-4}	5×10^{-4}	5.22×10^{-6}	5×10^{-4}	9×10^{-5}
0.00285	6.1×10^{-4}	0.00104	2.59×10^{-5}	0.001	2.3×10^{-4}
0.00332	5.8×10^{-4}	0.00201	1.8×10^{-4}	0.0015	2.9×10^{-4}
0.0038	5.0×10^{-4}	0.00301	1.8×10^{-4}	0.002	3.2×10^{-4}
0.0057	4.6×10^{-6}	0.004	1.5×10^{-4}	0.003	3.8×10^{-4}
		0.005	1.4×10^{-4}	0.004	4.6×10^{-4}
				0.005	4.8×10^{-4}

Las constantes de velocidad observada en función de metal o hidróxido añadidos, en los experimentos donde la concentración del otro componente permanecía fija, presentan forma de campana con un máximo agudo cerca de la relación $\text{Ca}^{2+}:\text{OH}^-$ 1:1. En el capítulo 5 se demostró que en este medio las constantes de formación de hidroxocomplejos han aumentado significativamente y la concentración de metal e hidróxido libres son mucho menores que sus concentraciones totales añadidas. Las velocidades de la reacción observadas en este caso tienen que estar correlacionadas con alguna de las especies presentes en disolución. La estequiometría del máximo sugiere que la especie activa es el complejo CaOH^+ . Debido a la pobre espectroscopía de los metales

alcalinotérricos estas especies no pueden ser detectadas directamente y sus concentraciones sólo pueden ser estimadas indirectamente a partir de las curvas de distribución de especies. En el caso de Ca^{2+} existe muy buena correlación entre la velocidad de reacción observada y la concentración de CaOH^+ (Figura 8.4) que permite calcular cuantitativamente el efecto de CaOH^+ . Al variar la concentración de Ca^{2+} e hidróxido simultáneamente, manteniendo la relación entre ellos 1:1 se observa que en este caso la constante de velocidad siempre sube, pero no es directamente proporcional a la concentración. Esto se debe al hecho de que la concentración de especies $\text{Ca}(\text{OH})^+$ no es una función lineal de la concentración total de metal y ligante debido a la existencia de otros equilibrios.

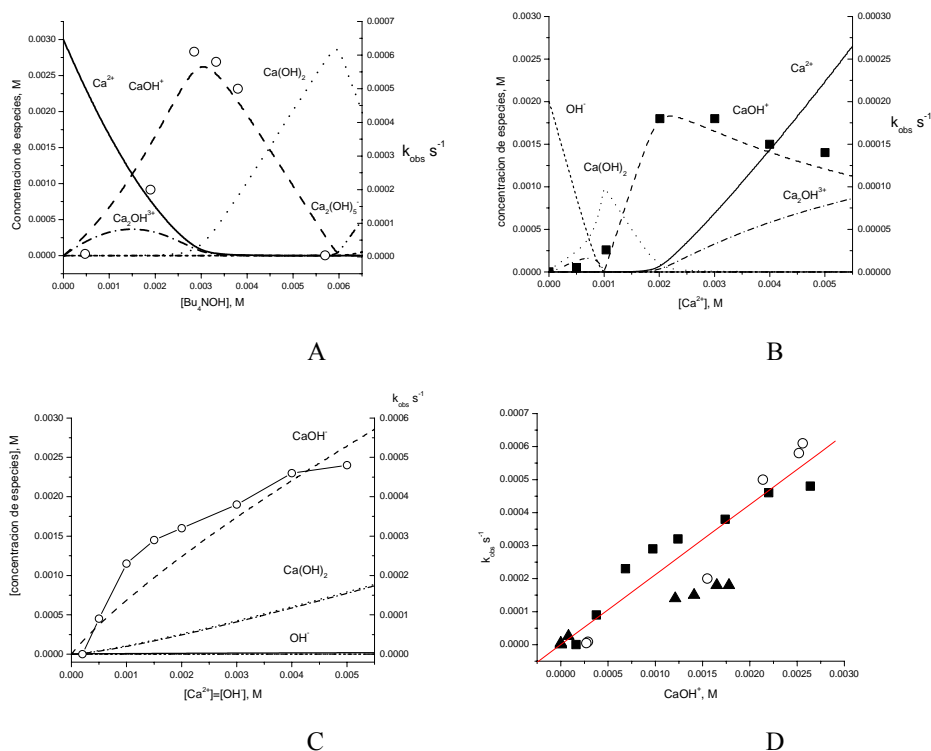


Figura 8.4. Resultados de experimentos con el ion Ca^{2+} . A. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para una solución 3 mM de $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ y Bu_4NOH variable B. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para una solución 1 mM de Bu_4NOH y $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ variable. C. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para Bu_4NOH y $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ variables manteniendo la relación $\text{Ca}^{2+}:\text{OH}^- = 1:1$ D. Constante de velocidad observada en función de la concentración de la especie activa CaOH^+ (cuadrados: variación de $\text{Ca}^{2+}:\text{OH}^-$ 1:1, círculos: variación de hidróxido a Ca^{2+} constante, triángulos: variación de Ca^{2+} a hidróxido constante)

Se obtuvieron relaciones lineales entre la concentración de monohidroxocomplejo del metal y la constante de velocidad observada. Sin embargo, entre los datos de los dos primeros experimentos existe una gran dispersión. Al unir los resultados obtenidos con los datos del tercer experimento – la variación simultánea de concentración del metal e hidróxido, se pudo descartar la dispersión, obteniendo una constante catalítica de segundo orden. (Figura 8.4).

La constante de segundo orden del ajuste lineal realizado a partir de todos los puntos experimentales es igual a $0.21 \pm 0.014 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Si en el punto máximo de la variación de OH^- a concentración del metal constante se calcula la velocidad de reacción asociada al hidróxido libre, se observa que el ion Ca^{2+} promueve una aceleración de la reacción en 7.3×10^8 veces. Este efecto tiene un contraste inmenso con lo que se observa en disolución acuosa donde la solución 3 mM de Ca^{2+} prácticamente no afecta la velocidad de hidrólisis comparándola con el blanco (Tabla 7.5).

Al cambiar el medio de agua a DMSO la concentración de monohidróxido creció, mientras que la concentración de hidróxido libre correspondiente a las condiciones del máximo de la velocidad de reacción disminuyó considerablemente. Sin embargo, si el cambio de disolvente hubiera afectado sólo las concentraciones de las especies presentes en disolución, la constante catalítica de segundo orden, que es independiente de las concentraciones, quedaría intacta. El incremento de este valor casi en 200 veces comprueba que el cambio de disolvente no sólo aumenta la concentración de la especie activa, sino también contribuye de alguna otra manera al mecanismo de la reacción. Los posibles efectos del cambio del mecanismo serán discutidos mas adelante.

8.2.2. Hidrólisis en presencia de iones Sr^{2+}

El mecanismo de reacción en presencia de iones Sr^{2+} es semejante al observado con Ca^{2+} . Se llevaron a cabo los mismos experimentos con el ion Sr^{2+} que con Ca^{2+} . El Sr^{2+} en estas condiciones también cataliza la hidrólisis de monoéster fosfato. Por esto, en cada experimento se han hidrolizado ambos nitrofenolatos. Los valores de constantes

observadas fueron encontrados por los ajustes a la reacción de primer orden con el desprendimiento consecutivo de 2 nitrofenolatos, utilizando la ecuación 4.3 (Tabla 8.3). Para la variación del hidróxido a concentración del metal constante se utilizó una solución 2 mM del $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ y para la variación del metal a concentración de hidróxido constante se utilizó una solución 2 mM de hidróxido; en la variación simultánea del metal y del hidróxido se mantuvo la relación constante entre ellos igual a 1:1, la concentración de BNPP en todos los casos fue constante e igual a 0.02 mM. A altas concentraciones de hidróxido se observó un precipitado de $\text{Sr}(\text{OH})_2$, lo que posiblemente afecte los valores de constantes observadas a altas concentraciones de OH^- .

Tabla 8.3. Resultados de experimentos con el ion Sr^{2+} . Se emplearon soluciones 2 mM del metal con hidróxido variable y de Bu_4NOH 2 mM con metal variable. La concentración de BNPP en todos los casos fue constante e igual a 0.02 mM

Bu_4NOH , M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	Sr^{2+} , M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$\text{Sr}^{2+}:\text{OH}^-$ = 1:1, M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$
0.0005	2.078×10^{-5}	4.45×10^{-4}	6.26×10^{-5}	1×10^{-4}	6.57×10^{-6}
0.001	0.00194	8.9×10^{-4}	6.0×10^{-4}	3×10^{-4}	3.1×10^{-4}
0.002	0.00238	0.00134	0.0014	5×10^{-4}	0.00121
0.003	0.00246	0.00178	0.00268	0.001	0.00239
0.004	0.00212	0.00223	0.0025	0.0015	0.00232
0.005	3.4E-4	0.00267	0.00371	0.002	0.00323
0.006	1.035×10^{-5}	0.00356	0.00279		
0.007	3.241×10^{-6}	0.00445	0.00403		

La interpretación de los resultados obtenidos con Sr^{2+} es menos clara que en el caso de Ca^{2+} . Esto se debe a la mayor incertidumbre en las constantes de formación de sus hidroxocomplejos (capítulo 5). El perfil de la constante de velocidad observada como función de la concentración del hidróxido indica de nuevo un máximo a la relación metal: hidróxido 1:1, sin embargo el óptimo no es tan bien definido como en el caso de Ca^{2+} . El perfil correspondiente para la variación en la concentración del catión metálico ya no presenta un máximo, sino una “saturación” al incrementar la concentración del metal. El análisis cuantitativo se realizó de la misma manera que con Ca^{2+} , (Figura 8.5). Como se observa en los tres casos los valores de k_{obs} otra vez siguen el perfil de distribución de los complejos $\text{Sr}(\text{OH})^+$.

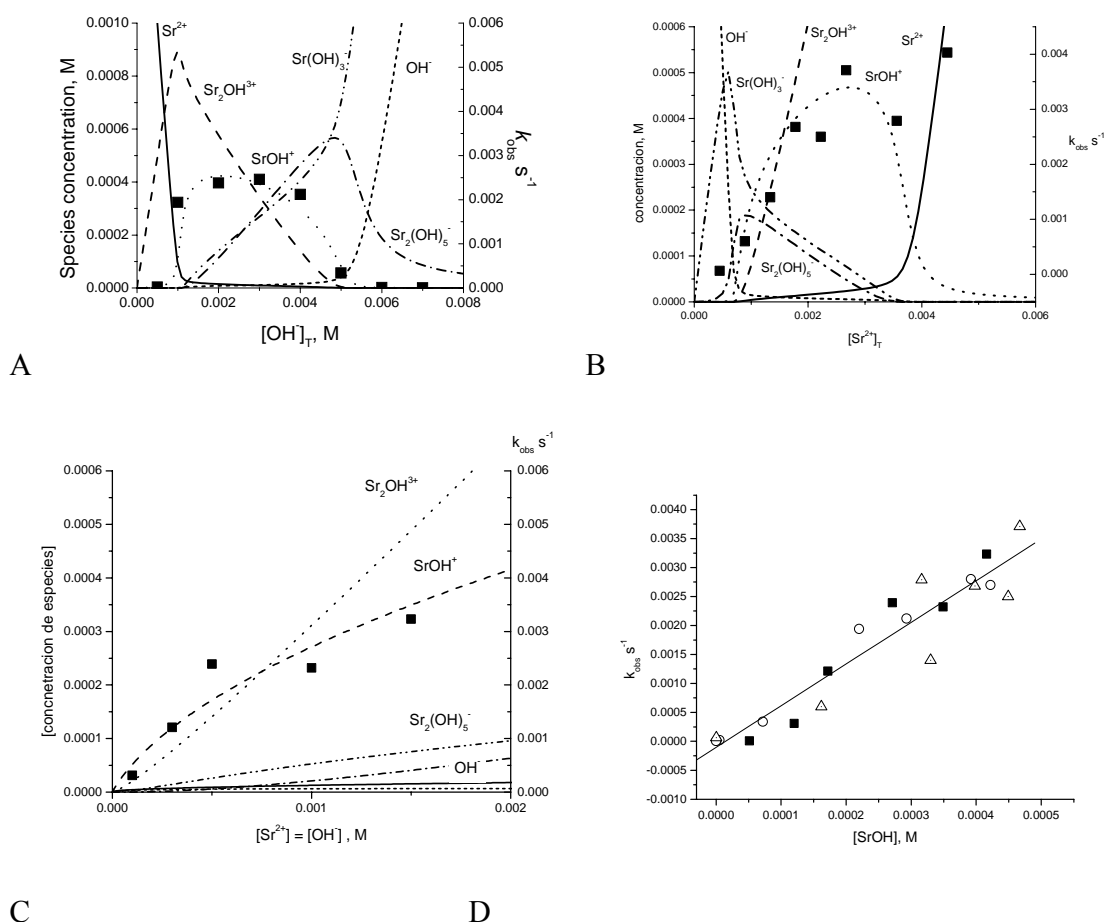


Figura 8. 5. Resultados de experimento con el ion Sr²⁺. A. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para una solución 2 mM de Sr(ClO₄)₂ y Bu₄NOH variable B. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para una solución 2 mM de Bu₄NOH y Sr(ClO₄)₂ variable. C. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para Bu₄NOH y Sr(ClO₄)₂ variables manteniendo la relación Sr²⁺:OH⁻ = 1:1 D. Constantes observadas en función de la concentración de la especie activa SrOH⁺ (cuadrados: variación de Sr²⁺:OH⁻ 1:1, círculos: variación de hidróxido a Sr²⁺ constante, triángulos: variación de Sr²⁺ a hidróxido constante)

Las constantes de velocidad observadas tuvieron una buena correlación con $[SrOH^+]$, a partir de la cual se encontró la constante catalítica de segundo orden. El valor obtenido en el ajuste lineal empleando todos los puntos es de $7.19 \pm 0.53 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La actividad del ion Sr²⁺ en estas nuevas condiciones es 40 veces mayor que la de Ca²⁺, y 10 000 veces mas grande que la constante observada en agua. Sin embargo, siendo el Sr²⁺ una base más débil que Ca²⁺, actúa a pH mas elevados. El aumento relativo de la velocidad de reacción en el máximo, comparándolo con la velocidad de la reacción basal

atribuida a la hidrólisis llevada a cabo por hidróxido libre en este punto es menor que en el caso de Ca^{2+} , dando el valor de 1.3×10^6 .

8.2.3. Hidrólisis en presencia de iones Mg^{2+}

Para el Mg^{2+} se llevaron a cabo los mismos experimentos que para los dos cationes anteriores. Al final de la reacción se registraba la salida de sólo un nitrofenolato – probablemente el Mg^{2+} es un pobre catalizador de monoéster fosfato en estas condiciones. Los valores de las constantes observadas fueron encontradas por los ajustes a la ecuación de primer orden, (4.2) (Tabla 8.4). Para la variación del hidróxido a la concentración del metal constante se utilizó $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 2 mM y para la variación del metal a concentración de hidróxido constante se utilizó hidróxido 2 mM; en la variación simultánea del metal y hidróxido se mantuvo una relación constante entre ellos igual a 1:1, la concentración de BNPP en todos los casos fue constante e igual a 0.02 mM.

Tabla 8.4. Resultados de hidrólisis de BNPP en DMSO 90% en presencia de hidróxido de Mg^{2+} . En el caso del metal variable se utilizó una solución de hidróxido 2 mM, mientras que para el experimento con hidróxido variable se utilizó metal 2 mM. Para encontrar una saturación de Michaelis-Menten se utilizaron concentraciones diferentes del metal e hidróxido, utilizando una relación entre ellos igual a $[\text{Mg}^{2+}]:[\text{OH}^-]=1:1$

OH^- , M	k_{obs} s^{-1}	Mg^{2+} , M	k_{obs} s^{-1}	$[\text{OH}^-]=[\text{Mg}^{2+}]$, M	k_{obs} s^{-1}
5×10^{-4}	1×10^{-5}	2.43E-4	2.04×10^{-6}	5×10^{-4}	2.45×10^{-5}
0.001	4.59×10^{-5}	4.05E-4	1.55×10^{-5}	0.001	1.85×10^{-4}
0.0015	0.00123	8.1E-4	8.1×10^{-4}	0.0015	0.00159
0.002	0.00227	0.00162	0.00192	0.002	0.00385
0.0025	0.00297	0.00243	0.00146	0.003	0.00697
0.003	0.00437	0.00324	0.00113	0.004	0.00719
0.0035	0.00552	0.00405	0.001	0.005	0.00741
0.004	0.00542	0.00486	8.7×10^{-4}	0.006	0.00787
0.0044	0.00297				
0.0046	0.00127				
0.0048	5.2×10^{-4}				
0.005	3.25×10^{-4}				
0.006	3.76×10^{-5}				
0.007	4.38×10^{-5}				
0.008	4.34×10^{-5}				

El análisis de resultados reveló que no hay actividad catalítica que asociar a (MgOH^+). Probablemente, este ion desactiva demasiado al hidróxido, por lo cual el

ataque nucleofílico se vuelve poco dominante en el mecanismo de la reacción. Por otro lado, la especie de MgOH^+ existe en disolución en muy bajas concentraciones, dismutando fácilmente a $\text{Mg}(\text{OH})_2$. La comparación de las curvas de distribución de especies y las curvas de las constantes observadas nos permiten suponer que la especie responsable por la catálisis en este caso es $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (Figura 8.6)

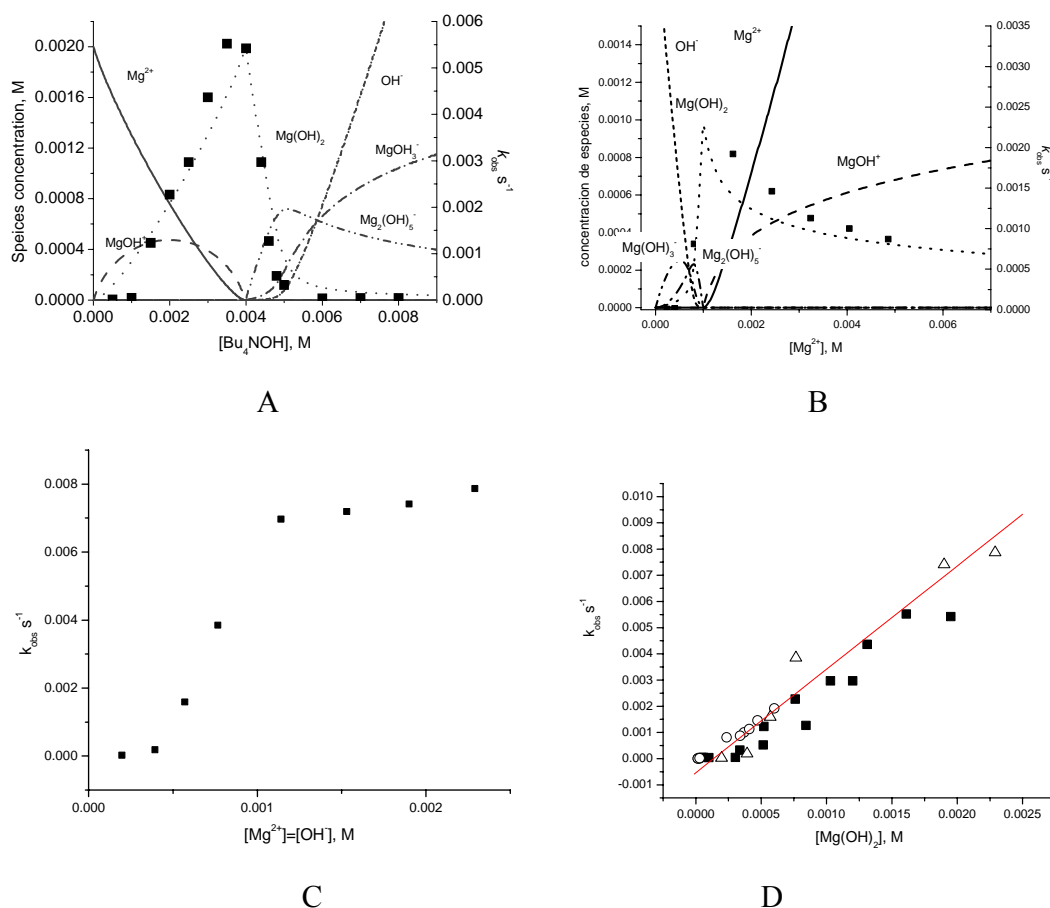


Figura 8.6. Resultados de experimentos con el ion Mg^{2+} . A. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 2 mM y Bu_4NOH variable B. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para Bu_4NOH 2 mM y $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ variable. C. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para Bu_4NOH y $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ variables manteniendo la relación $\text{Mg}^{2+}:\text{OH}^- = 1:1$ D. Constantes observadas en función de la concentración de la especie activa MgOH^+ (cuadrados: variación de hidróxido a Mg^{2+} constante, círculos: variación de Mg^{2+} a hidróxido constante, triángulos: variación de $\text{Mg}^{2+}:\text{OH}^- 1:1$)

La constante catalítica a partir de ajustes a todos los puntos de la reacción es de $3.47 \pm 0.18 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Es difícil de creer que la actividad catalítica tan alta puede depender de una especie sin carga ni momento dipolar. Sería más lógico suponer, que en realidad la especie activa es un dímero $\text{Mg}_2(\text{OH})_4$. Si los datos cinéticos de los tres experimentos se grafican en coordenadas logarítmicas (Figura 8.7) se obtiene una pendiente que varía de 1.7 a 2.3 de un experimento a otro. Debido a la alta dispersión de datos, este valor puede ser tomado como 2, es decir, en realidad la reacción es de orden dos con respecto al $\text{Mg}(\text{OH})_2$. Como ya se ha dicho, los ajustes de las curvas de titulación potenciométrica permiten la existencia de dímero en vez de monómero de $\text{Mg}(\text{OH})_2$, sin cambiar mucho los parámetros de ajuste ni la distribución de especies. Por lo cual, la especie catalítica en este caso es $\text{Mg}_2(\text{OH})_4$ cuya posible estructura se discutirá en el capítulo 11.

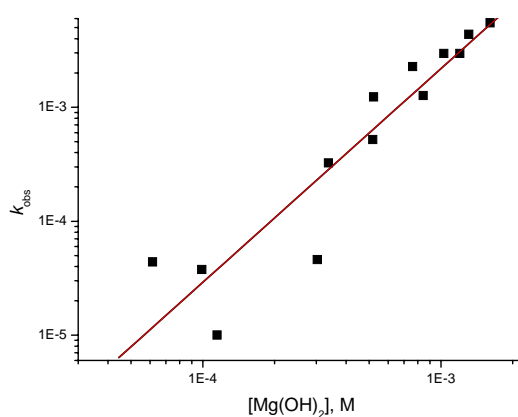


Figura 8.7. Cambio de constante de velocidad observada al variar la concentración de hidróxido libre en coordenadas logarítmicas. La pendiente observada en este caso es 1.9

8.2.4. Determinación de la energía de activación de BNPP en DMSO 90%

Anteriormente se determinaron las energías de activación para la hidrólisis de BNPP por diferentes especies hidroxometálicas en agua. Ya que la reactividad de estas especies en el DMSO 90 % resultó ser muy elevada, era importante ver en qué parámetro de activación, entalpía o entropía (factor pre-exponencial A) se manifestaría este efecto. Para calcular las energías de activación de la hidrólisis de BNPP en DMSO 90 %, se hizo una aproximación, considerando que la distribución de especies a todas las temperaturas era la misma que a 37 °C o al menos el óptimo de las concentraciones activas se

encuentra aproximadamente en el mismo intervalo de las concentraciones de los componentes. Para la hidrólisis básica se utilizó Bu₄NOH 0.05 M, para la hidrólisis en presencia de Ca²⁺ y Sr²⁺ se utilizaron soluciones 2 mM del metal y 3 mM de hidróxido para cada caso. En el caso de Mg²⁺ se utilizaron soluciones 2mM del metal y 4 mM de hidróxido. Estas concentraciones del metal e hidróxido corresponden en el diagrama de distribución de especies a 0.000937 M de Ca(OH)⁺, 0.0004 M de SrOH⁺ y 0.0019 M de Mg(OH)₂. Los resultados de mediciones a diferentes temperaturas se encuentran en Tabla 8.7 y las gráficas correspondientes en las coordenadas de Arrhenius en la Figura 8.8.

Tabla 8.6 Resultados experimentales para la determinación de E_a de la reacción de hidróxocomplejos de los metales alcalinotérreos con BNPP en DMSO 90 %.

Temperatura, °C	k _{obs} s ⁻¹ , OH ⁻	k _{obs} s ⁻¹ , Mg ²⁺	k _{obs} s ⁻¹ , Ca ²⁺	k _{obs} s ⁻¹ , Sr ²⁺
8		7E-4		
16		0.00152		
17	3.25E-5		8.7224E-7	2.4E-4
22		0.00129		
25		0.00244		
27	1.01E-4	0.00332		
30	3.78E-4	0.00377		
37			2.6236E-4	0.00227
40		0.004		
45	0.00115		1.73069E-4	0.00348
47	3.25E-5		1.4242E-5	0.00128
50		0.00965		
55			7.2E-4	0.00738

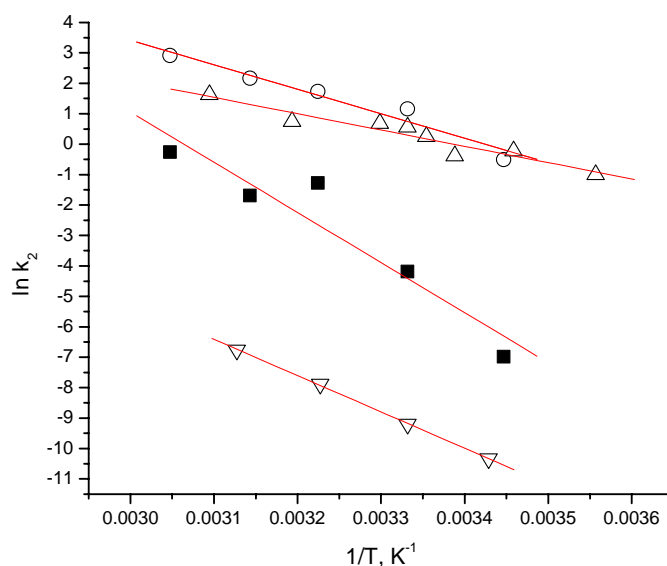


Figura 8.8 Cálculo de la energía de activación de la hidrólisis de BNPP con diferentes hidroxocomplejos metálicos en DMSO 90 %.(Triángulos hacia abajo: hidrólisis básica, triángulos hacia arriba: hidrólisis en presencia de Mg^{2+} , cuadrados negros: hidrólisis en presencia de Ca^{2+} , círculos: hidrólisis en presencia de Sr^{2+})

Tabla 8.7 presenta los valores de la energía de activación y factores pre-exponenciales para todas especies reactivas.

Tabla 8.7 Energía de activación de los sistemas catalíticos de los hidróxidos de metales alcalinotérreos con BNPP en 90 % de DMSO acuoso.

Especie	$E_a, kJ/mol$	$\ln A$
OH^-	99.2 ± 1.5	30.5 ± 0.63
$Mg(OH)_2$	44.5 ± 5.5	18.1 ± 2.2
$Ca(OH)^+$	137 ± 25	50 ± 10
$Sr(OH)^+$	67 ± 8	27 ± 3.4

Comparando estos resultados con los valores encontrados para el agua (Tabla 7.9), se pueden hacer varias conclusiones. Primero, el cambio de disolvente no afecta la energía de activación de hidrólisis básica en límites del error experimental. En el sistema del Mg^{2+} en DMSO la energía de activación disminuye considerablemente. Este cambio de energía por 26.5 kJ/mol es casi el doble de la energía de transferencia del cation Mg^{2+} de agua a DMSO (Tabla 2.3) y por esto no puede ser atribuido a un simple cambio en

solvatación del metal o su hidroxocomplejo, e implica un cambio en el mecanismo de la reacción. Esta observación está en acuerdo con el cambio de la especie activa que ocurre en este caso. La energía de activación para $\text{Sr}(\text{OH})^+$ cambia por una cantidad de 11 kJ/mol que esta en el intervalo de las energías esperadas por el cambio en solvatación de los reactivos. En el caso de Ca^{2+} , la energía de activación aumenta muy fuertemente y entonces la reactividad elevada de $\text{Ca}(\text{OH})^+$ en DMSO es un efecto entrópico. Es difícil proponer alguna explicación lógica de por que esto ocurre, sólo podemos ver que el comportamiento anómalo del Ca^{2+} se manifiesta no únicamente en mucho más baja reactividad relativa de su hidroxocomplejo en DMSO, pero además en mucho más alta energía de activación para esta especie.

8.3 Hidrólisis de HPNPP

El HpNPP presenta mecanismos de reacción diferentes al observado para BNPP, por lo cual, su estudio en DMSO 90 % es importante para ver cómo el medio de la reacción afecta la velocidad de reacción, donde cambia el mecanismo y no hay un ataque nucleofílico directo por parte del hidróxido.

Se repitieron los mismos experimentos que en el caso de la hidrólisis de BNPP. Sin embargo, la actividad catalítica de Sr^{2+} y Ca^{2+} resultó tan alta, que para su estudio fue necesario utilizar la técnica de stoped-flow.

8.3.1. Hidrólisis en presencia de iones Mg^{2+}

La hidrólisis de HpNPP en presencia de Mg^{2+} se llevó a cabo con Mg^{2+} 1 mM y hidróxido variable y Bu_4NOH 2 mM con concentración de metal variable. Los resultados están presentados en la tabla 8.8.

En este caso la mejor correlación entre la curva de distribución de especies y constantes de velocidad observadas de nuevo fue para $\text{Mg}(\text{OH})_2$. Al pasar los datos de Figura 8.9C a coordenadas logarítmicas se observa el orden de reacción de 1 a 1.3, por lo cual es probable que la especie activa en este caso sea $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

Tabla 8. 8 Resultados de hidrólisis de HPNPP en DMSO 90% en presencia de hidróxido de Mg^{2+} . En el caso del metal variable se utilizó una concentración de 2 mM de hidróxido, mientras que para el experimento con hidróxido variable se utilizó 1 mM del metal. La concentración de HPNPP fue de 0.02 mM.

$[Mg^{2+}]_T$	$[Mg(OH)_2]$	$k_{obs} s^{-1}$	$[OH^-]_T$	$[Mg(OH)_2]$	$k_{obs} s^{-1}$
0	0	0.00133	1×10^{-4}	1.37×10^{-5}	1.9×10^{-4}
1×10^{-4}	1.18×10^{-5}	0.00385	2×10^{-4}	3.81×10^{-5}	0.00163
3×10^{-4}	6.33×10^{-5}	0.01148	3×10^{-4}	6.62×10^{-5}	0.00328
4×10^{-4}	1.83×10^{-4}	0.01681	4×10^{-4}	9.63×10^{-5}	0.00936
0.001	3.77×10^{-4}	0.03922	5×10^{-4}	1.28×10^{-4}	0.00481
0.002	3.02×10^{-4}	0.02765	7×10^{-4}	1.95×10^{-4}	0.03185
0.003	2.6×10^{-4}	0.02178	8×10^{-4}	2.3×10^{-4}	0.029
0.007	1.73×10^{-4}	0.01132	0.0012	3.9×10^{-4}	0.06429
0.008	1.61×10^{-4}	0.01086	0.0014	4.87×10^{-4}	0.07164
0.009	1.5×10^{-4}	0.00728	0.0018	7.62×10^{-4}	0.07798
0.01	1.41×10^{-4}	0.01034	0.002	9.94×10^{-4}	0.11483
			0.0028	1.22×10^{-4}	0.02602
			0.003	9.29×10^{-5}	0.016
			0.0034	6.54×10^{-5}	0.01095

Las constantes catalíticas para la especie $Mg(OH)_2$ se calculan a partir de ajustes lineales a todos los puntos experimentales y es de $116 \pm 8 M^{-1} s^{-1}$. Probablemente la basicidad del hidróxido en la especie $Mg(OH)_2$ es suficiente para la desprotonación del grupo alcoholico del sustrato en el estado de transición y la reacción requiere menos activación electrofílica por parte del ion metálico debido a la reactividad muy elevada del nucleófilo intramolecular.

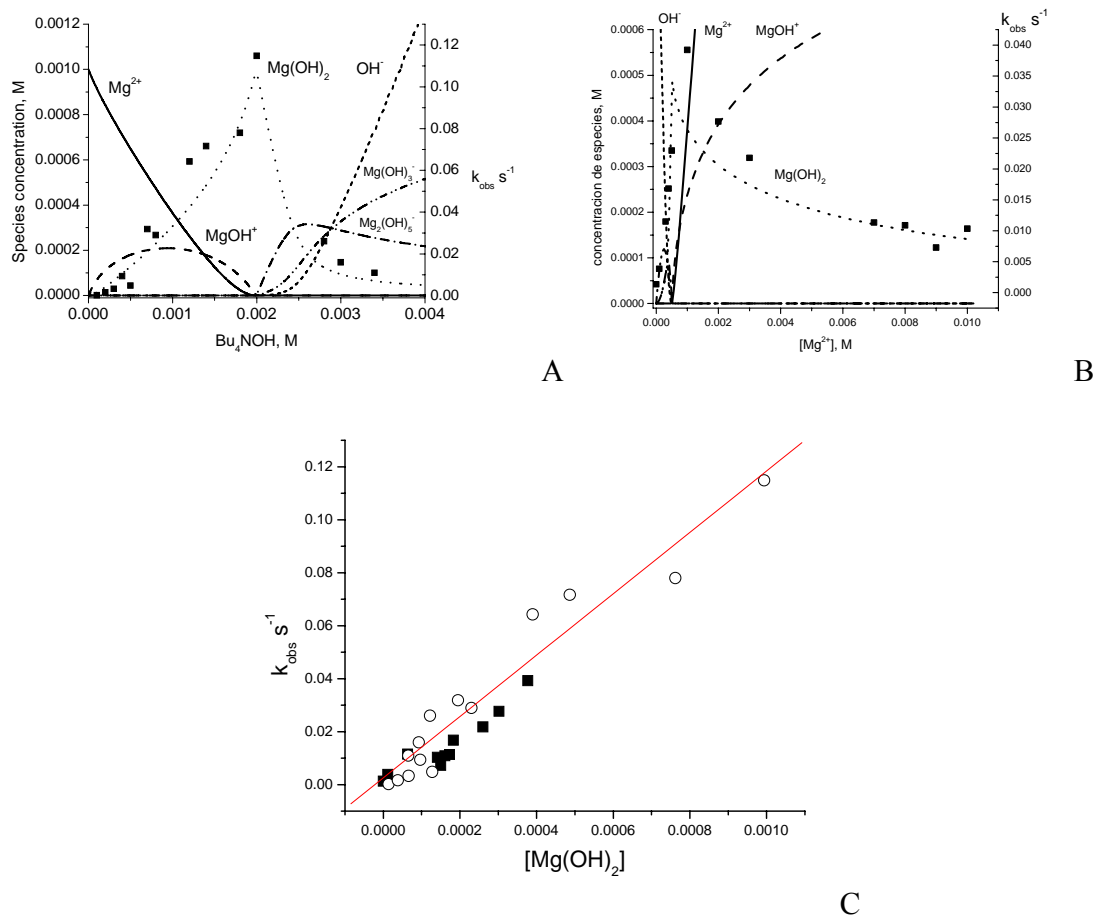


Figura 8.9 Resultados de los experimentos con el ion Mg^{2+} . A. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM y Bu_4NOH variable B. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para Bu_4NOH 2 mM y $Mg(ClO_4)_2$ variable. C. Constante de velocidad observada en función de la concentración de la especie activa $Mg(OH)_2$ (cuadrados: variación de metal, círculos: variación de hidróxido)

8.3.2. Hidrólisis en presencia de iones Ca^{2+}

Para el ion Ca^{2+} se llevaron a cabo las variaciones de hidróxido con Ca^{2+} 1 mM constante y las variaciones del metal a 1 mM de Bu_4NOH (Tabla 8.9). La concentración del metal no se elevó más debido a que las constantes observadas de las reacciones resultaron muy rápidas para hacer mediciones.

Tabla 8.9 Resultados de la hidrólisis de HpNPP en DMSO 90% en presencia de hidróxido de Ca^{2+} . En el caso del metal variable se utilizó una concentración de 1 mM de hidróxido, mientras que para el experimento con hidróxido variable se utilizó 1 mM del metal. . La concentración de HpNPP fue de 0.02 mM.

$[\text{OH}^-]$	$[\text{Ca}(\text{OH})^+]$	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$[\text{Ca}^{2+}]$	$[\text{Ca}(\text{OH})^+]$	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$
1.80×10^{-4}	9.39×10^{-6}	0.01096	1×10^{-4}	3.08×10^{-9}	0.00415
3.61×10^{-4}	3.19×10^{-5}	0.00978	2×10^{-4}	7.87×10^{-9}	0.0024
5.41×10^{-4}	7.91×10^{-5}	0.0665	3×10^{-4}	1.91×10^{-8}	0.01585
7.22×10^{-4}	2.48×10^{-4}	0.14971	4×10^{-4}	6.32×10^{-8}	0.00624
9.025×10^{-4}	4.86×10^{-4}	0.43239	6×10^{-4}	1.99×10^{-4}	0.1366
0.00108	7.02×10^{-4}	0.56427	8×10^{-4}	5.68×10^{-4}	0.36298
0.00126	8.54×10^{-4}	0.95805	0.001	7.82×10^{-4}	0.54551
0.00144	8.91×10^{-4}	1.50297	0.002	3.56×10^{-4}	0.24381
0.00162	8.53×10^{-4}	1.05059	0.003	1.46×10^{-4}	0.1429
0.00181	7.49×10^{-4}	1.41041			
0.00199	6.27×10^{-4}	1.50477			
0.00217	4.84×10^{-4}	0.15967			
0.00235	2.97×10^{-4}	0.09704			
0.00253	1.34×10^{-4}	0.04874			
0.00271	2.63×10^{-6}	0.02464			
0.00316	1.14×10^{-7}	0.01023			
0.00361	2.97×10^{-8}	0.0107			
0.00406	1.45×10^{-8}	0.00976			

Se observó una correlación bastante buena con la concentración de la especie CaOH^+ , igual que en el caso de BNPP. (Figura 8.10). Las desviaciones ligeras entre las concentraciones de la especie y la constante de velocidad observada se atribuyeron a la dispersión de datos. La dependencia de la velocidad observada en la concentración de monohidróxido obedece a una distribución lineal.

En este caso la constante catalítica se determinó a partir de todos los puntos experimentales. Su valor en este caso es de $690 \pm 49 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El ion Ca^{2+} en este sistema resulta más eficiente que el ion Mg^{2+} . Su actividad catalítica es 200 veces más grande que la actividad del hidróxido libre.

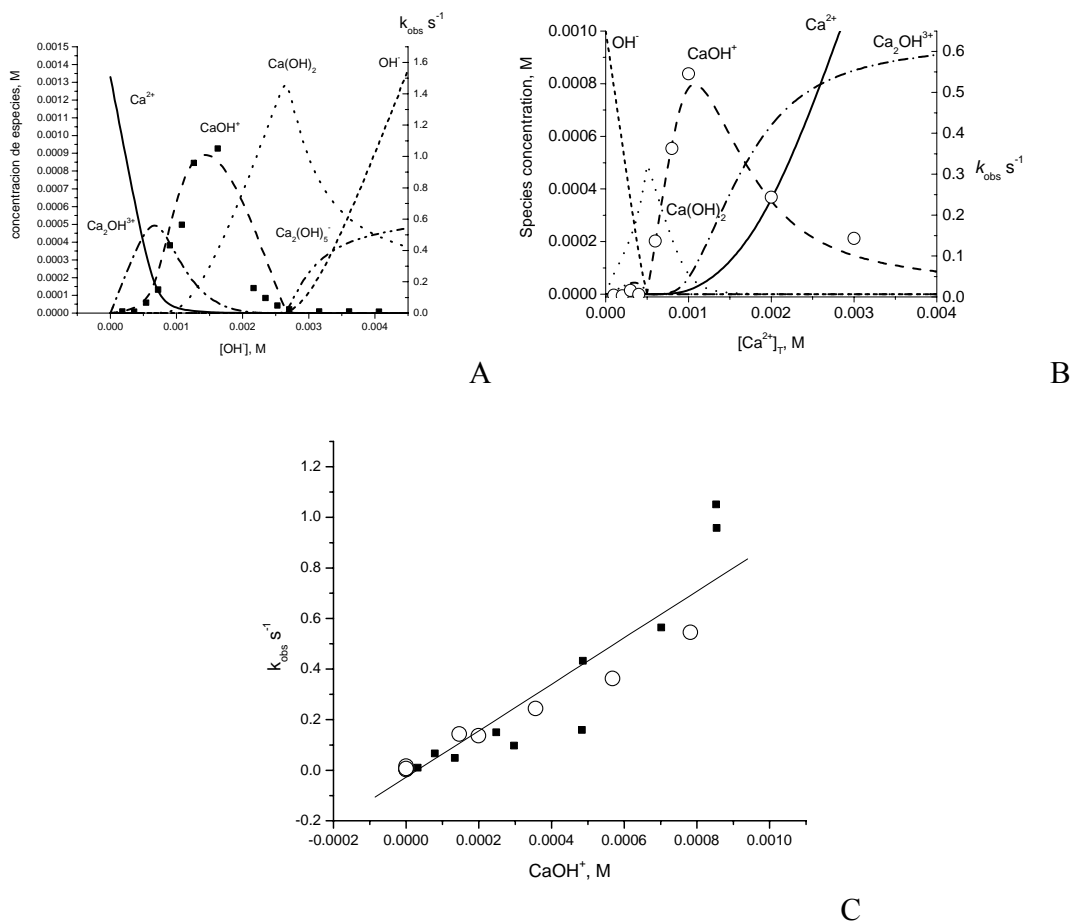


Figura 8.10 Resultados de los experimentos con el ion Ca^{2+} . A. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para $Ca(ClO_4)_2$ 1 mM y Bu_4NOH variable B. Constante de velocidad observada y la distribución de especies para Bu_4NOH 2 mM y $Ca(ClO_4)_2$ variable. C. Constante de velocidad observada en función de la concentración de la especie activa $CaOH^+$ (cuadrados: variación del hidróxido, círculos: variación del metal)

8.3.3. Hidrólisis en presencia de iones Sr^{2+}

En el caso del ion Sr^{2+} para medir constantes catalíticas se utilizó la técnica de stoped-Flow para medir constantes de velocidad observadas que llegan en este caso hasta $1000 s^{-1}$.

Los resultados experimentales se presentan en la Tabla 8.10 y Figura 8.11. Como es claro de estos resultados, la actividad catalítica del catión es sobresaliente y sobrepasa por órdenes de magnitud la actividad de otros cationes, sin embargo, tal como fue en el

caso de BNPP, la interpretación de los resultados cinéticos para Sr^{2+} es menos exacta debido a mayor incertidumbre en las constantes de estabilidad de sus hidroxocomplejos. El experimento con concentración de metal variable, no se presenta debido a alta dispersión de datos.

Tabla 8.10 Resultados de hidrólisis de HpNPP en DMSO 90% en presencia de hidróxido de Sr^{2+} . Para el experimento con hidróxido variable se utilizó una solución 1 mM del metal. La concentración de HpNPP fue de 0.02 mM.

$[\text{OH}]_{\text{T}}, \text{M}$	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
4.75×10^{-4}	61.87
9.5×10^{-4}	352.00
0.00143	918.40
0.0019	397.94
0.00237	5.20
0.00285	1.32
0.00332	0.0138
0.0038	0.00364

Sin embargo, las correlaciones de constantes observadas experimentales con las concentraciones de las especies activas en estos casos no fueron muy buenas (Figura 8.12) La correlación lineal para obtener la constante catalítica de segundo orden se llevó a cabo descartando el punto más elevado. La variación de la constante observada de casi 10^6 veces sólo puede ser explicada por la alta actividad del hidroxocomplejo obtenido. Los últimos puntos en la tabla 8.9 son muy bajos en comparación con el resto, sin embargo, corresponden con bastante precisión a la actividad de hidróxido libre sobrante después de formar la especie catalíticamente inactiva tipo $\text{Sr}_2(\text{OH})_5^-$ o $\text{Sr}(\text{OH})_3^-$

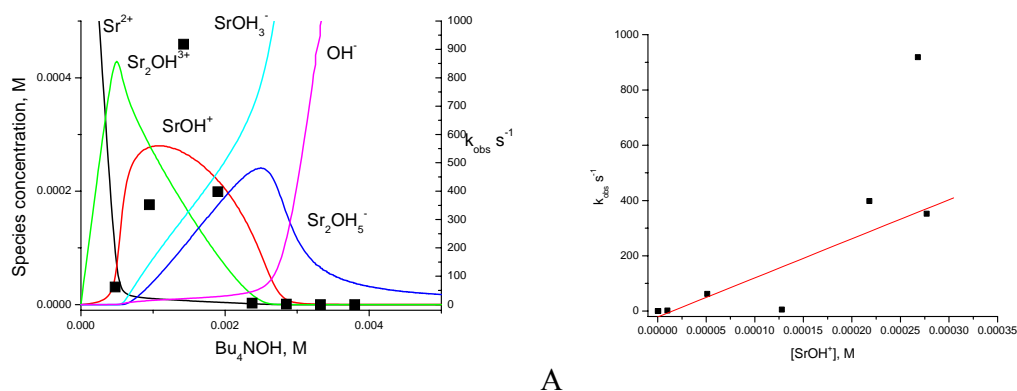


Figura 8.11. A. Correlación entre la concentración de especies activas y la velocidad de la reacción observada. B. Correlación entre los resultados obtenidos y la concentración de la especie activa. La constante catalítica se calculó descartando el punto más alto.

La constante catalítica de segundo orden en este caso es de $1.41 \pm 0.31 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ – el valor más alto conocido hasta la fecha para este sustrato. Sin embargo, existen varios problemas en la evaluación de la constante. Sobre todo por la baja estabilidad de los valores máximos observada y la pobre correlación entre los resultados experimentales y la especie observada. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que para generar las hidroxoespecies de Sr^{2+} en disolución es necesario ir a medios significativamente más básicos que para cationes de Mg^{2+} y Ca^{2+} lo que disminuye su eficiencia de catálisis estimada como una aceleración sobre la velocidad del blanco.

Capítulo 9

Factores que afectan el equilibrio de formación de las especies activas

En el capítulo anterior se encontraron las correlaciones entre perfiles de constantes de hidrólisis observadas y las concentraciones de las especies presentes en la disolución. El sistema mejor estudiado es el sustrato BNPP. Durante el trabajo se observaron varios factores que afectan la velocidad de la reacción, tales como la presencia de CO_2 absorbido del aire, la fuerza iónica infligida por diversas sales y la presencia de algunos ligantes. Estos efectos se deben en primer lugar a los cambios en la distribución de las especies hidroxiladas por efectos salinos que afectan las constantes de formación de especies activas o por competencia de los ligantes e iones metálicos añadidos por OH^- . No hemos hecho un estudio detallado de la naturaleza de estos efectos, sin embargo es importante reportarlos para una descripción más completa del sistema.

9.1 Efectos de las sales neutras

En mi trabajo de licenciatura notamos un efecto extraño del NaCl si se utilizaba con $\text{Mg}(\text{Cl})_2$.⁽²⁸⁾ La hidrólisis de BNPP no se observaba en presencia del cloruro de Mg^{2+} y Bu_4NOH como base, sin embargo, la actividad aparecía si se ocupaba NaOH como base o se agregaba NaCl . El efecto desapareció al cambiar la sal de MgCl_2 a $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Sin embargo, en presencia de bajas concentraciones de NaClO_4 como electrolito de soporte la constante de velocidad observada se eleva ligeramente. Se observó que el efecto depende de la concentración de la base. Así, cuando las concentraciones de Bu_4NOH fueron mas bajas que las concentraciones del metal, el efecto catalítico de sodio no se presentaba o era inhibitor. Sin embargo, al pasar el máximo y llegar a concentraciones del hidróxido mayores que las concentraciones del metal, la presencia de Na^+ eleva la velocidad de la reacción hasta 20 veces. (Figura 9.1)

Probablemente esto se debe a que NaOH en mezclas de DMSO – agua no se disocia por completo, por lo cual los iones Na^+ disminuyen la concentración de iones libres de OH^- , desplazando así la reacción a las condiciones de máximo de velocidad. Es

probable, que en el caso de MgCl_2 la presencia de Na^+ atraiga los iones de Cl^- , aumentando así la disociación de la sal, y formación de las especies activas.

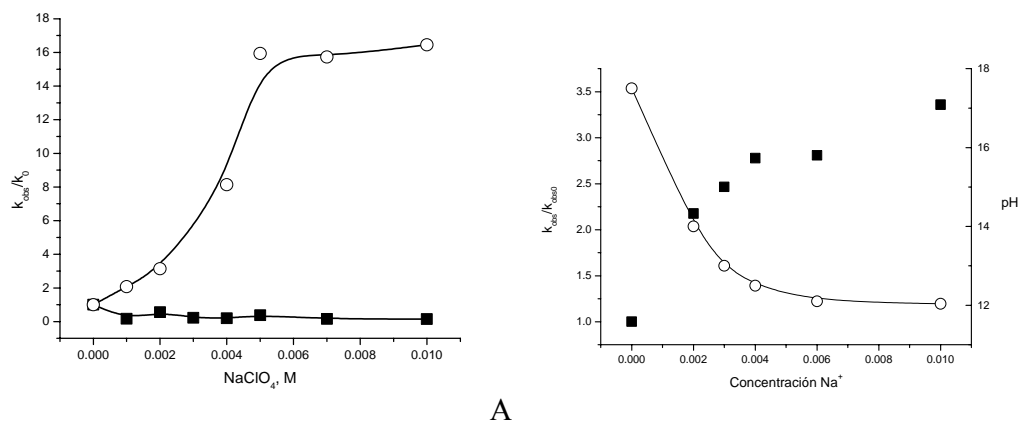


Figura 9.1 A. Efecto de NaClO_4 sobre la velocidad de reacción en presencia de 2 mM de Mg^{2+} (cuadrados: antes del máximo, OH^- 2 mM, círculos: después del máximo, OH^- 5 mM), B Efecto de NaClO_4 sobre la hidrólisis de BNPP en presencia de iones Ca^{2+} después del máximo (Ca^{2+} 2 mM, OH^- 4 mM) (cuadrados: cambio de constante de velocidad, círculos: cambio de pH).

El efecto se observó también para los iones de Ca^{2+} y Sr^{2+} (dando aumento de 12 y 50 veces respectivamente). En el caso de la hidrólisis en presencia de iones Ca^{2+} se midió el pH en cada celda, lo que comprobó la disminución de concentración de hidróxido libre en presencia de iones Na^+ , regresando el valor de pH a 12-14 el nivel donde están presentes las especies activas.

Es probable que el cambio en la concentración de aniones libres sea el único efecto de los iones Na^+ . Se realizaron pruebas adicionales en presencia de la sal, verificando si ésta podría cambiar las cantidades de dióxido de carbono absorbido y así prevenir la reacción, sin embargo, resultó que la adición de otros compuestos al medio de reacción no cambia la magnitud del efecto de la inhibición del sistema expuesto al aire.

La presencia de una alta fuerza iónica inhibe la reacción (Figura 9.2). La inhibición es muy fuerte para los iones Mg^{2+} , y débil para los iones Sr^{2+} . Puede ser que esto se deba a la competencia entre cationes de la sal que impone la fuerza iónica y las especies catalíticas por la unión al sustrato. En el caso de Mg^{2+} el aumento de la fuerza iónica es probablemente responsable de la destrucción de dímeros de dihidroxocomplejos que son los responsables de la actividad catalítica del metal.

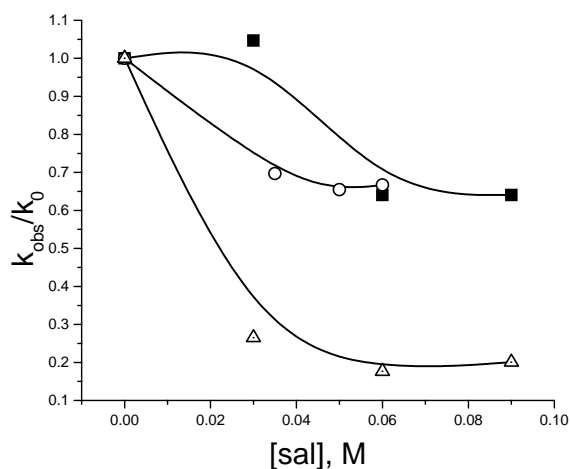


Figura 9.2 Efecto de la fuerza iónica impuesta por sales diferentes sobre la velocidad de hidrólisis de BNPP en presencia de Sr^{2+} (cuadrados: LiClO_4 , círculos abiertos: Bu_4NClO_4 , triángulos: Bu_4NBr).

En todos los casos la adición de un electrolito causa la disminución de la actividad catalítica de los iones metálicos (Figura 9.2). En el medio parcialmente acuoso, la adición de un electrolito podría haber aumentado la conductividad del medio, lo que lleva a menor constante de atracción entre las cargas de signo diferente, como son M^{2+} con OH^- o MOH^+ con el sustrato. Por otra parte, la adición de la sal que posee un anión ligante relativamente bueno, como Br^- , disminuye la velocidad de la reacción más que en el caso de un peor ligante, como es el ion perclorato. Por otra parte, el cambio de catión de la sal de Bu_4N^+ a Li^+ no lleva a grandes diferencias en el cambio de la reactividad. Por lo cual, se puede suponer que ambos cationes no compiten con los productos en la unión al sustrato ni son lo suficientemente buenos como ácidos de Lewis para competir por el OH^- .

9.2 Efecto de ligantes orgánicos

Se ha tratado de modificar el sistema utilizando diferentes tipos de ligantes con el propósito de obtener hidrocomplejos más estables debido al efecto estabilizador del ligante conocido en medios acuosos.⁽¹⁾ Además se esperaría que los complejos ternarios metal-ligante- OH^- podrían ser más fácil de caracterizar, por ejemplo empleando

espectroscopía de RMN. Desgraciadamente, la actividad catalítica de estos sistemas siempre resultó ser menor que la de los metales libres.

En presencia de ligantes neutros, tales como TRIS, la velocidad de reacción disminuye aparentemente por coordinarse con el metal.

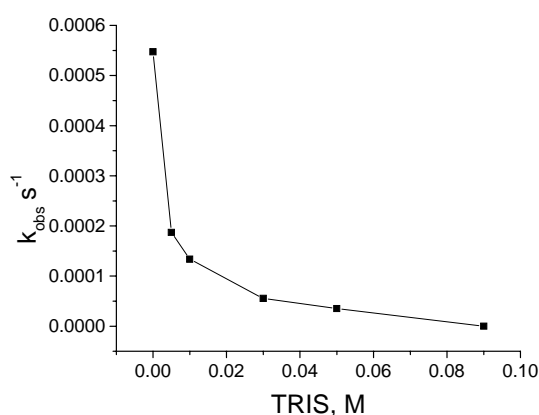


Figura 9.3 Efecto de concentración de buffer TRIS sobre la velocidad de hidrólisis de BNPP. En una solución de Sr^{2+} 1 mM, Bu_4NOH 0.5 mM.

El perfil de la concentración de TRIS implica una constante de formación del complejo $Sr(TRIS)^{2+}$ mayor que la estimada para este sistema.⁽⁴⁴⁾ Sin embargo, los valores de la literatura se han medido en presencia de fuerza iónica 0.25 M, lo que cambia ligeramente los valores obtenidos. Es probable que a la disminución de la velocidad además contribuya el aumento de la fuerza iónica, cuyo efecto se discutió en el capítulo 9.1.

Los ligantes aniónicos, tales como aminoácidos, inhiben la actividad de los metales alcalinotérreos aún a bajas concentraciones. La constante de formación de los complejos aumenta bruscamente al pasar de agua a DMSO para ligantes aniónicos. Por lo cual, es probable que los ligantes cargados compitan con el ion hidróxido por los sitios disponibles en el ion metálico. Al unirse al metal bajan su acidez. Y al unirse dos ligantes, o un ligante y el hidróxido al metal forman una especie sin carga que no puede realizar la hidrólisis.

Se puede concluir que para metales alcalinotérreos la composición óptima de especies activas es además la más simple – es el hidroxicomplejo del metal libre de ligantes adicionales de cualquier tipo. Para futuras aplicaciones esto puede crear

problemas, ya que será difícil unir los metales a los ligantes responsables por el reconocimiento de las secuencias de ADN y ARN.

9.3 Otros disolventes

El disolvente DMSO fue elegido debido a sus propiedades de disolvente polar aprótico. Sin embargo, no se sabía si esta elección era la óptima. Se han probado otros disolventes: DMF, dietilformamida y acetonitrilo. En todos los disolventes las propiedades catalíticas de los metales alcalinotérreos fueron peores que en DMSO. Una de las razones en este caso fue la baja solubilidad de sales metálicas y sus hidróxidos.

En mezclas DMF – agua la actividad catalítica crece respecto a la observada en agua pura, Figura 9.4. Sin embargo, las actividades catalíticas en DMF son 10 veces mas bajas en comparación con DMSO para Sr^{2+} y Ca^{2+} y no se observa ninguna actividad para Mg^{2+} que precipita. En CH_3CN y dietilformamida la reacción no se registra debido a la precipitación de los complejos.

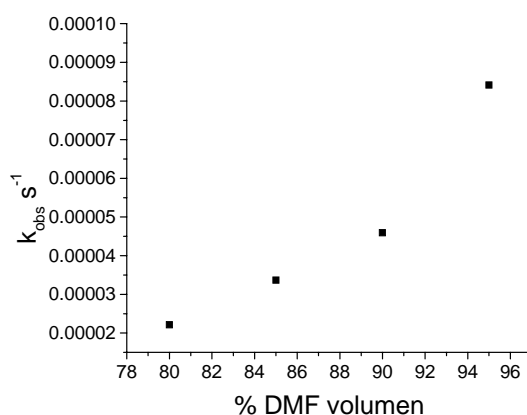


Figura 9.4 Efecto de la concentración de DMF sobre la hidrólisis de BNPP en presencia de Sr^{2+} 2 mM y Bu_4NOH 3 mM.

Estos resultados se consideraron como la prueba suficiente de que el DMSO es el disolvente óptimo para llevar a cabo la reacción.

Capítulo 10.

Desarrollo de un sistema catalítico con el uso de disoluciones amortiguadoras

10.1 Selección de las disoluciones amortiguadoras

El sistema descrito presenta las constantes catalíticas más altas entre los valores conocidos hasta la fecha en la literatura. Sin embargo, el sistema propuesto posee desventajas en su uso práctico. Las disoluciones para mediciones cinéticas se preparan mezclando cantidades conocidas del metal y de hidróxido total, lo que dificulta la interpretación de resultados ya que en cada mezcla se varían las concentraciones de todas especies. En contraste, en un sistema amortiguador la concentración del hidróxido libre se mantiene fija y esto nos permitiría un análisis de perfiles velocidad – concentración de metal más preciso y más sencillo. Además, tomando en cuenta la dificultad en las mediciones de pH en DMSO, en particular a valores altos, el uso de un amortiguador con el valor de pKa conocido presenta una ventaja al evitar esta medición y preparar una disolución de pH conocido mezclando los componentes del sistema amortiguador en una cierta relación. El uso de un buffer posee una ventaja adicional. La poca estabilidad de las disoluciones al aire, entre otras cosas debido al consumo de OH⁻ por el CO₂ del aire puede ser mejorada teniendo el buffer cuya concentración es mucho mayor que la del metal, siendo una fuente de OH⁻ libre que ayuda a recuperar su concentración a pesar de que cierta cantidad se consume por el CO₂.

Existen muchas disoluciones amortiguadoras conocidas, entre ellos, TRIS, MES, HEPES etc., que se utilizan en reacciones biológicas y que no afectan mucho velocidades de reacción y las concentraciones de las especies en el equilibrio. Sin embargo, para este sistema la selección de un buffer fue bastante complicada. Primero, muchos buffers conocidos son especies neutras a pH ácido y especies aniónicas a pH básicos, pero los ligantes aniónicos inhiben la catálisis. Por lo tanto, la selección se redujo a buffers que son catiónicos en su forma ácida y neutros en su forma básica.

Otro problema consiste en que el disolvente empleado estabiliza el protón, por lo cual la reacción de la forma neutra del buffer con el protón es menos favorecida, y la

forma neutra es débil como base. Por lo cual, teniendo, por ejemplo, un buffer que actúa a pH neutro en agua (alrededor de 7) vamos a tener un buffer que actúe cerca de este intervalo de pH en la mezcla DMSO-agua. Sin embargo, el pH 7 en mezclas DMSO-agua es un pH ácido donde no existen especies activas.

Para la selección de un amortiguador apropiado se aplicaron los siguientes criterios: 1) el buffer tiene que existir como una especie neutra y catiónica en sus formas de base y ácido conjugado, respectivamente; 2) el buffer tiene que ser un ligante pobre para los metales alcalinotérreos 3) el buffer tiene que actuar a pH alcalino en agua que corresponde al pH neutro en DMSO debido al aumento fuerte de pK_w . Muy pocos buffers satisfacen estas condiciones, entre ellos varias aminas. Para las pruebas fueron seleccionados: TRIS, Bis-Tris Propano, 1,5-diaminopentano (cadaverina) y cloruro de guanidino. Sus propiedades en agua se presentan en la figura 10.1.

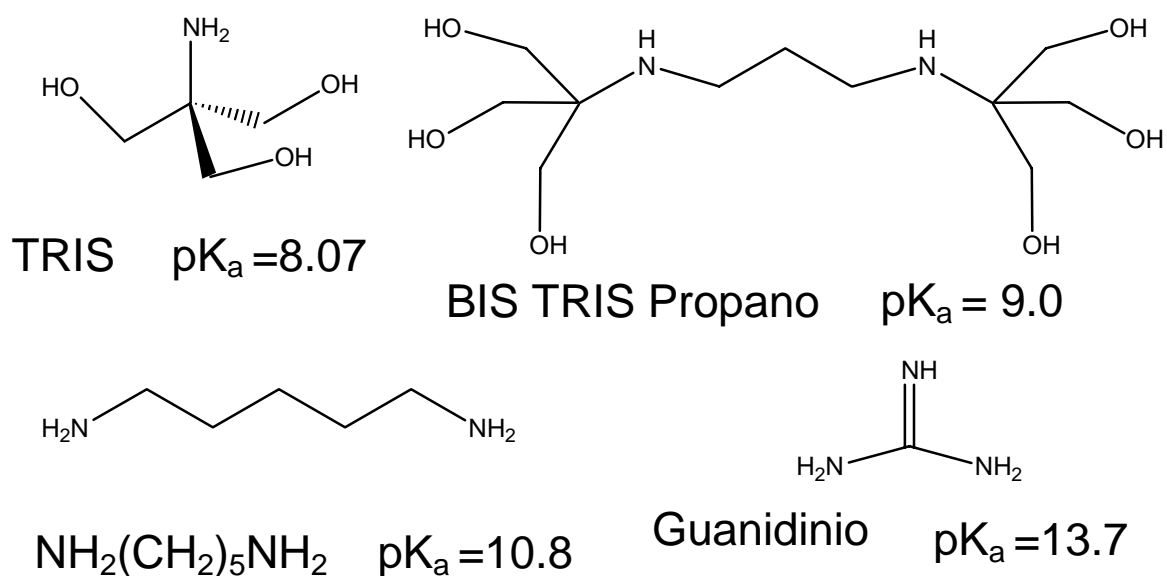


Figura 10.1 Los buffers utilizados y sus pK_a correspondientes en agua.

Se estudió la hidrólisis de HpNPP y BNPP. En cada caso se seleccionó una concentración conocida del buffer – no muy alta, para prevenir la formación de complejos con el metal. En algunos casos se fijó la relación ácido – base. En otros se utilizó el buffer en su forma básica. En estas condiciones se midió la constante observada a diferentes concentraciones del metal, hasta obtener una relación lineal confiable. Se

determinó experimentalmente el pK_a del guanidinio en DMSO 90% (ver abajo). Para el TRIS se tomó el valor de la literatura⁽⁴⁴⁾ igual a 10.11. Para el resto de buffers se consideró que existe una correlación entre su pK_a en agua y en el DMSO-agua 90%.

El pK_a del guanidinio en DMSO se encontró mediante titulaciones potenciométricas por triplicado, Figura 10.2. El valor del pK_a obtenido es de 14.78. El pH del buffer neutralizado al 40 % es de 14.3.

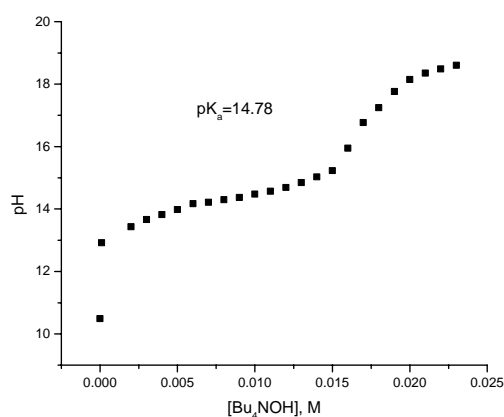


Figura 10.2 Determinación de pK_a de guanidinio mediante titulación potenciométrica de una solución 0.02 M del compuesto a 37 °C.

Los buffers en ausencia de la sal metálica no afectan la velocidad de hidrólisis de BNPP. La hidrólisis de HpNPP es afectada por la concentración del buffer guanidinio, presentando una dependencia de segundo orden cinético respecto de la concentración total del buffer.

El guanidino neutralizado al 40% acelera la hidrólisis del HpNPP (Tabla 10.1, figura 10.3). La velocidad de reacción depende de la concentración del buffer de manera cuadrática. Las constantes observadas en este caso son $0.0334 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción de primer orden y $0.253 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para la reacción de orden 2.

Al variar la relación de ácido/base manteniendo la concentración total del buffer igual a 0.05 M se observa un máximo en la velocidad cuando las concentraciones de ácido y base son iguales. Esto indica que se trata de un mecanismo clásico de hidrólisis por el buffer descrito por Breslow para imidazoles^{(48), (49)} que catalizan la hidrólisis del ARN. En este caso, la forma básica del buffer actúa como un base general y desprotona al

2-hidroxiopropilo, mientras que la forma ácida se comporta como ácido general y estabiliza el estado de transición. El mecanismo se presenta en la figura 10.4.

Tabla 10.1 Efecto del guanidinio en la hidrólisis de HpNPP. Efecto de la concentración de guanidinio neutralizado al 40% y efecto de la concentración de la base añadido a guanidinio 0.05 M.

[Guanidinio] neutralizado al 40 %, M	$k_{obs} s^{-1}$	[Bu ₄ NOH], M [Guanidinio] 0.5 M	$k_{obs} s^{-1}$
0.01	1.17E-4	0.01	0.00187
0.02	5.1E-4	0.02	0.00228
0.03	0.00101	0.025	0.00248
0.04	0.00144	0.03	0.00208
0.05	0.00209	0.04	0.00137
0.06	0.00267	0.05	0.0045
0.07	0.00333	0.06	0.0291

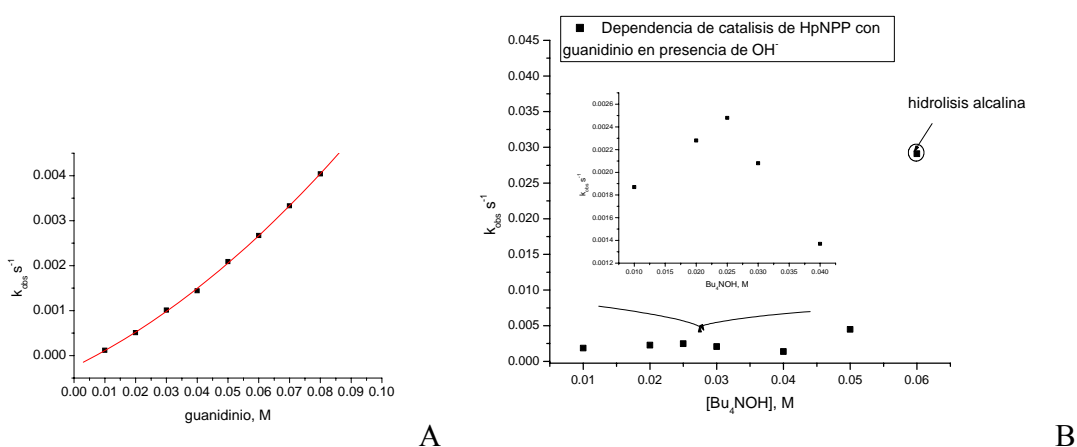


Figura 10.3 Efecto de guanidinio sobre la hidrólisis de HpNPP A. Efecto de concentración de guanidinio neutralizado al 40% B. Efecto de la concentración de la base en el guanidinio 0.05M. En la gráfica el último punto corresponde exactamente a la constante de hidrólisis básica observada con 10 mM de la base.

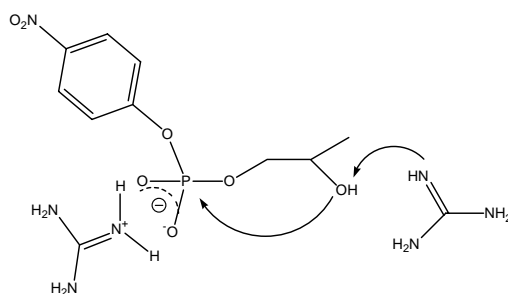


Figura 10.4. Mecanismo de catálisis por guanidinio

Al realizar experimentos con HpNPP se observó, que las constantes obtenidas para el ion Sr^{2+} son mucho mayores que las constantes de hidrólisis debido al buffer solo. Por lo tanto, se consideró que el guanidinio puede ser utilizado como buffer ya que su aportación a la reacción no es muy grande. El buffer es un ligante pobre, por lo cual el efecto catalítico observado se atribuye sólo a los complejos metálicos formados.

10.2 Hidrólisis de HpNPP en presencia de iones Sr^{2+} en buffers.

Para facilitar el estudio, se seleccionó el catalizador más activo. En el caso de Sr^{2+} y HpNPP como sustrato, se observaron velocidades de reacción muy lentas para los buffers TRIS y bis-tris Propano. Para los buffers con pK_a menor que el de TRIS, por ejemplo, Bis-Tris, las constantes de reacción eran muy bajas y durante una hora de reacción no se observó salida registrable del nitrofenolato.

Los resultados experimentales al variar la concentración del metal en diferentes buffers fueron siguientes (Tabla 10.2).

Tabla 10.2 Hidrólisis de HpNPP en presencia de Sr^{2+} y diferentes buffers.

$[\text{Sr}^{2+}]$, M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ BTP	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ TRIS	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$	$[\text{Sr}^{2+}]$, M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ Guanidinio
0	2.28E-6	4.4E-6	0	1E-4	--
0.001	8.3E-4	4.7E-4	--	3E-4	0.17539
0.002	0.00121	5.3E-4	0.00218	5E-4	0.4462
0.003	0.00123	6.5E-4	0.00264	9E-4	0.87326
0.004	0.00168	9.6E-4	0.00345	0.0015	2.02537
0.005	0.00196	8.7E-4	0.00461	0.002	3.08293

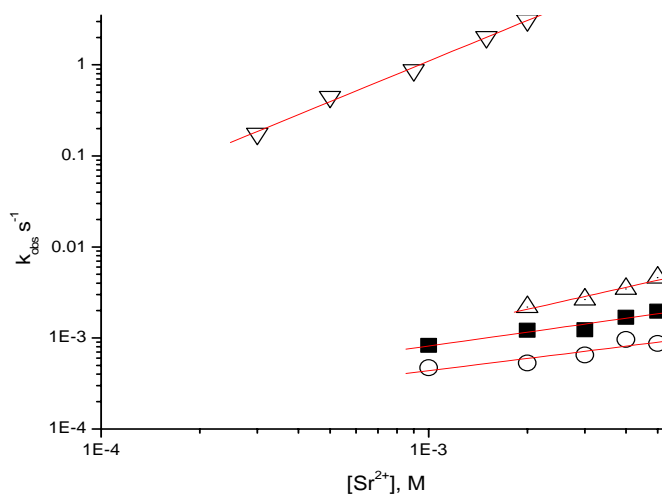


Figura 10.5 Hidrólisis de HpNPP en presencia de diferentes concentraciones de Sr^{2+} en 4 buffers con diferentes pK_a . (cuadrados: BTP, círculos: TRIS, triángulos hacia arriba: cadaverina, triángulos hacia abajo: guanidinio)

Al graficar las constantes en coordenadas logarítmicas, se observa un orden de 1/2 a pH bajo producido por TRIS, Bis-Tris Propano y cadaverina; probablemente esto se debe a la inhibición por $\text{Sr}_2\text{OH}^{3+}$. A pH más elevado, sin embargo el orden de reacción es de 1.

10.3 Hidrólisis de BNPP con metales alcalinotérreos y guanidinio

Los experimentos del capítulo 10.2 sirvieron como fundamento para encontrar el sistema buffer más satisfactorio. Se seleccionó el guanidinio. Este buffer fue utilizado para llevar a cabo la hidrólisis de BNPP.

En el caso de hidrólisis por parte de Ca^{2+} y Sr^{2+} se observó una saturación en la velocidad de la reacción asociada a la formación de especies de baja actividad M_2OH^{3+} (orden de reacción 0.3 y 0.6 respectivamente), en cambio, el orden de reacción para Mg^{2+} fue de 1.5.

Tabla 10.4 Hidrólisis de BNPP con metales alcalinotérreos en presencia de guanidinio

$[\text{M}^{2+}]$, M	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Sr^{2+}
0	2.21E-6	1.78823E-6	9.81526E-7

1E-3	4.6E-4	8.65645E-5	4.29836E-5
0.002	0.00201	1.02229E-4	8.09188E-5
0.003	0.00235	1.29963E-4	1.41752E-4
0.004	0.00346	1.32271E-4	1.07391E-4
0.005	0.00456	1.33885E-4	1.18554E-4

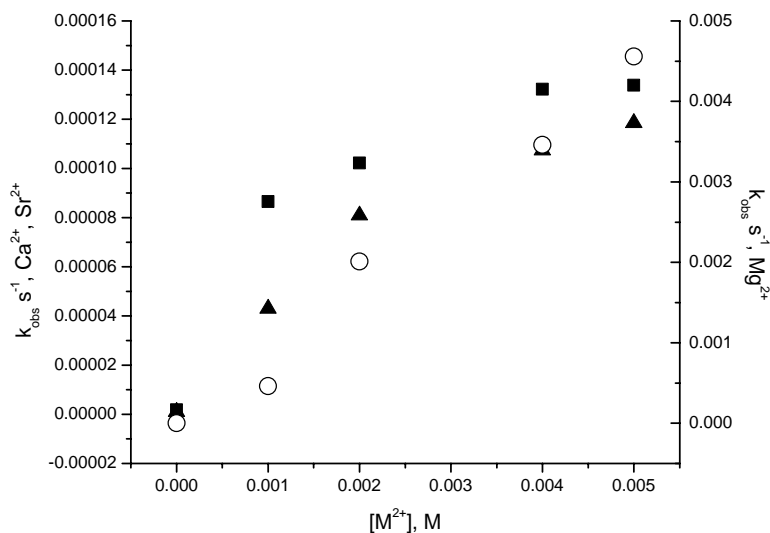


Figura 10.5 Hidrólisis de BNPP como función de la concentración de los metales alcalinotérreos. La escala a la izquierda representa valores experimentales de k_{obs} para Ca^{2+} y Sr^{2+} . La escala a la derecha para Mg^{2+} . Se calcularon las constantes catalíticas de segundo orden a metal 2 mM.

A partir de los resultados obtenidos en el punto donde la concentración del metal es de 2 mM, fue calculada la constante catalítica y su valor se comparó con los valores obtenidos al variar Bu_4NOH a concentración del metal fija.

Tabla 10.5 Constante catalítica obtenida en el punto donde la concentración del metal es igual a 2 mM.

Metal	[especie activa], M	$k_{obs} s^{-1}$	$k_2 M^{-1} s^{-1}$
Mg^{2+}	1.95e-3	0.00201	1.03077
Ca^{2+}	3e-4	8.65645E-5	0.28855
Sr^{2+}	6.06e-5	4.29836E-5	7.16394

Como se puede observar, las constantes para Ca^{2+} y Sr^{2+} coinciden perfectamente con los valores calculados a partir de OH^- libre. El valor para Mg^{2+} es 3 veces menor que el esperado, sin embargo, considerando que el buffer está presente como cloruro de la sal

y que las constantes medidas para Mg^{2+} son fácilmente afectables por equilibrios colaterales, este valor puede ser considerado como cierto.

10.4 Estabilidad de la disolución.

Una de las hipótesis que teníamos al utilizar disoluciones amortiguadoras, era conseguir mayor estabilidad de los hidroxocomplejos formados. Esta hipótesis se comprobó perfectamente – la solución más inestable de todos que con el ion Mg^{2+} y se llevó a cabo en dos ocasiones – bajo N_2 y al aire dejándola reposar una hora antes de iniciar. En presencia del buffer los resultados fueron bastante reproducibles. Después de estar una hora expuesto al aire la velocidad de reacción decae 8% de su valor original (Figura 10.5), mientras que en el caso de la adición de una concentración fija de la base la velocidad de reacción decae varias veces en este lapso de tiempo (ver capítulo 4).

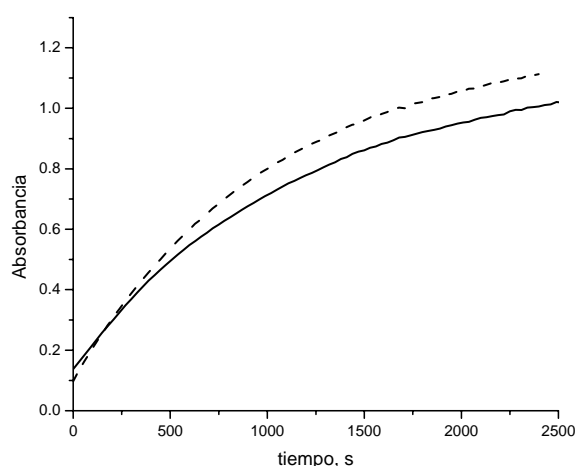


Figura 10.5 Estabilidad de hidroxocomplejo de Mg^{2+} en el tiempo. Línea punteada: velocidad de la reacción en presencia de iones Mg^{2+} medida al instante de preparar la disolución. Línea sólida: la misma reacción cuya velocidad se ha medido después de 1 hora de preparación, dejando la muestra al aire.

El uso de disoluciones amortiguadoras llevó a obtener resultados reproducibles. Además, los hidroxocomplejos formados en este caso resultaron ser más estables con el paso del tiempo. Por lo tanto, el uso de buffers crea sistemas más simples y con posible

aplicación práctica a partir del sistema potencialmente eficiente pero poco estable de hidroxocomplejos en DMSO.

Capítulo 11.

Discusión de resultados

11.1 Propuesta de un mecanismo

Se llevaron a cabo los estudios de velocidades de reacción en agua y DMSO 90% para los tres sustratos diferentes. Las curvas de constantes de velocidad observadas en los resultados pueden corresponder a dos mecanismos de reacción diferentes. En el primer caso, la especie activa es MOH^+ (por ahora no vamos a considerar el caso de Mg^{2+} dinuclear) que actúa como nucleófilo y estabilizador del estado de transición de la reacción. En el siguiente caso, las especies activas son M^{2+} y OH^- , donde el metal estabiliza el estado de transición, mientras que el hidróxido actúa como base general, obteniendo una reacción de tercer orden.

Normalmente no se puede distinguir entre estos dos mecanismos, debido a que el perfil de la reacción es idéntico en ambos casos. Sin embargo, se puede estimar la constante catalítica en el caso de que la reacción proceda por el segundo mecanismo. Para encontrar la cota inferior de constantes con este mecanismo de reacción se utilizaron los resultados del metal menos activo, el ion Ca^{2+} . Su constante catalítica de tercer orden fue calculada como función del producto de concentraciones del hidróxido y de metal libre, obteniendo una constante catalítica de $4 \times 10^9 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, que se encuentra más allá del límite difusional de velocidad de reacción de tercer orden. Por lo que la reacción se lleva a cabo mediante un mecanismo de segundo orden, donde el catalizador es el hidroxocomplejo del metal alcalinotérreo.

11.1.1 Hidrólisis de PNPPDPP.

En el caso de PNPPDPP los valores de las constantes de segundo orden son más bajos que la constante de hidrólisis alcalina, esto indica que en la hidrólisis de triésteres fosfato los hidróxidos de metales alcalinotérreos participan sólo como fuentes de

núcleófilos (hidróxido) y son incapaces de influir en el mecanismo de reacción, estabilizando el estado de transición (Tabla 11.1).

Tabla 11.1 Hidrólisis de PNPDP en presencia de metales alcalinotérreos. El valor de k_{obs} presentado es el valor de la constante de la velocidad observada en la saturación.

	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$	$k_2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1(a)}$	efecto catalítico en el mínimo ^(b)
OH-		28	
Mg ²⁺	1.0×10^{-5}	0.01483 (Mg(OH) ₂)	640
Ca ²⁺	8.0×10^{-5}	0.0254 (Ca(OH) ₂)	1.4
Sr ²⁺	0.01	14.6 (Sr(OH) ⁺ + Sr(OH) ₃ ⁻)	9.5

(a) asociada a la especie predominante en el mínimo

(b) $k_{\text{obs}}/k_{\text{OH}}[\text{OH}^-]$ en el mínimo

La constante observada de hidrólisis del triéster puede ser una buena medida de la fuerza del nucleófilo unido al catión, que se desactiva mucho en presencia de Mg²⁺, pero solo pierde un poco la actividad al coordinarse con Sr²⁺. La constante de la velocidad de hidrólisis que ellos presentan indica que tan desactivado se encuentra el hidróxido en la disolución. Las magnitudes de las constantes se encuentran en buena correlación con las magnitudes de las constantes de formación de monohidroxocomplejos de metales alcalinotérreos (Tabla 5.4). Al cambiar el medio de agua a DMSO 90% se aumenta la acidez de los cationes y se tienen las especies que presentan actividad en un medio donde la concentración de hidróxido libre es menor o igual que en el medio neutro en agua.

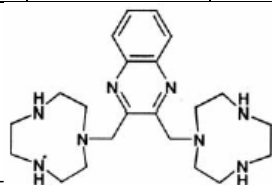
Curiosamente, el ion Sr²⁺, que presenta los valores más elevados de constante observada no tiene gran efecto catalítico, ya que siendo un ácido débil existe en medio más básico que el resto de los iones. De tal forma que el mejor desempeño catalítico lo presenta el ion Mg²⁺, que existe en un medio prácticamente neutro. El efecto catalítico es presentado en la última columna de la tabla 11.1 y se determinó como factor de las velocidades de reacción observadas, cuando la relación entre el metal y OH⁻ es 1:2 (el mínimo en las gráficas) y la constante de velocidad calculada a una concentración de OH⁻ correspondiente en este punto (obtenida a partir de los diagramas de distribución de especies).

11.1.2 Hidrólisis de BNPP

En la tabla 11.2 se presentan los datos experimentales de la hidrólisis de BNPP en DMSO 90%. Para entender mejor el efecto del disolvente estos datos se comparan con las constantes observadas en agua.

Tabla 11.2 Hidrólisis de BNPP en presencia de metales alcalinotérreos en DMSO 90 %

	$k_2, M^{-1}s^{-1}$ en DMSO 90%	k_{2DMSO}/k_{2H_2O}	k_{2MOH}/k_{2OH}	$k_{OH}[OH^-](s^{-1})$ en el máximo	Incremento de velocidad en el máximo
OH^-	1.7×10^{-4}	4.6	1		
$Mg(OH)_2$	3.43	9600	20200	1.0×10^{-11}	5.0×10^8
$CaOH^+$	0.28	300	1650	8.4×10^{-13}	7.3×10^8
$SrOH^+$	7.0	7900	41200	2.0×10^{-9}	1.3×10^6
$La(OH)_2^{-a(68)}$	0.26 (25°C)				
$[Zn_2L^b(OH_3)]^{+a(4)}$	4.2×10^{-3} (35°C)				



a) en agua b) L =

Los últimos dos renglones de la tabla presentan constantes hidrolíticas de BNPP para los iones lantánidos, los sistemas catalíticos más eficientes conocidos hasta la fecha. El Zn^{2+} es el ion biológico mejor estudiado en la hidrólisis de ésteres fosfato. Nuestro sistema supera ambas constantes presentadas.

El simple aumento de concentración de la especie activa no puede explicar el elevado valor de la constante de segundo orden. Es probable que el mecanismo general cambie en este caso. La variabilidad en la actividad catalítica del hidróxido libre puede ser asociada al cambio de energía debido a su deshidratación. Para los iones metálicos el cambio de constante catalítica es mucho mayor, por ejemplo; en el caso de la hidrólisis en medio acuoso, la comparación entre la actividad catalítica de los metales alcalinotérreos

en agua sugiere un aumento de actividad de 20 a 50 veces. Al cambiar el disolvente este cambio llega ser mayor de 40 000 veces. De los resultados de hidrólisis de PNPDP se sabe que el carácter nucleofílico de los compuestos disminuye considerablemente al cambiar de agua a DMSO. Por lo que es posible suponer que en este caso el ataque nucleofílico deja de tener un papel tan importante en el mecanismo catalítico. Es posible que ahora el papel principal del ion metálico sea la estabilización del estado de transición. Por otro lado, es probable que las partículas catalíticas en la disolución sean en realidad conglomerados, con fórmula mínima $M(OH)_2$ o MOH^+ . Se sabe que la actividad de los complejos diméricos es siempre mayor que la de los complejos monoméricos debido al efecto sinérgico.

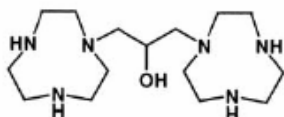
Una manera más de evaluar el efecto de los metales alcalinotérreos es con el cálculo del efecto catalítico. Es decir, la diferencia entre la velocidad de reacción observada en presencia de catalizador y la velocidad de reacción que se observaría si el catalizador no estuviera presente. Gracias a que las constantes de formación de las especies activas han aumentado considerablemente, en la disolución existe una baja concentración de OH^- libre. El aumento total de la velocidad de reacción calculada en este caso para llegar a la actividad catalítica observada es de 10^6 a casi 10^9 veces. El ion Sr^{2+} , que posee muy alta constante de segundo orden es poco activo a pH mas bajos donde Ca^{2+} es casi igual de eficiente que Mg^{2+} gracias a su pKa bajo. Por lo que probablemente esta diferencia en las actividades sea la clave de la selección de estos metales en las hidrolasas naturales. El efecto catalítico de Sr^{2+} observado en el presente trabajo es por lo menos 1000 veces mayor que para los sistemas binucleares con Sr^{2+} descritos en la literatura.⁽²⁷⁾ En general, el desempeño catalítico de estos iones metálicos es muy bueno.

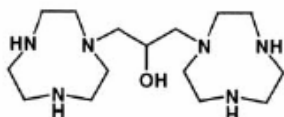
11.1.3 Hidrólisis de HPNPP

En la tabla 11.3 se presenta un breve resumen de la actividad catalítica de los metales alcalinotérreos con HpNPP.

Tabla 11.3 Resumen de la actividad catalítica de los hidróxidos de metales alcalinotérreos en DMSO 90% con HpNPP

Especie	$k_2, \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{2\text{DMSO}}/k_{2\text{H}_2\text{O}}$	$k_{2\text{MOH}}/k_{2\text{OH}}$	$k_{\text{OH}}[\text{OH}^-]$ en el máximo	Efecto catalítico en el máximo
OH^-	3.37	34.14	1	-	-
$\text{Mg}(\text{OH})_2$	116	169.60	34.5	8.45×10^{-11}	1.3×10^9
$\text{Ca}(\text{OH})^+$	690	219.49	204.8	2.04×10^{-9}	2.4×10^8
$\text{Sr}(\text{OH})^+$	1.4×10^6	6.51×10^5	4.15×10^5	1.72×10^{-5}	2.31×10^7
$[\text{Zn}_2\text{L}^{\text{b}}\text{H}^{-1}\text{OH}_2]^{\text{+a}}$	0.71 (25°C)				
$\text{Tb}^{3+ (24)}$	0.57(37 °C) ^(c)				



a) en agua, b) L=  c) constante de segundo orden calculada a partir de la dependencia de metal a pH=6.5

Al comparar los valores obtenidos en nuestros experimentos con los valores mas altos obtenidos por otros autores, observamos que Mg^{2+} (el ion menos eficiente en este caso) supera los mejores valores reportados por dos órdenes de magnitud, mientras que el ion Sr^{2+} los supera hasta 7 órdenes de magnitud, resultando el sistema catalítico artificial mas eficiente hasta el momento.

El cambio en la constante catalítica de segundo orden al pasar de agua a DMSO es mucho mayor para el ion Sr^{2+} con este sustrato que con BNPP. Al mismo tiempo, el efecto del ion Ca^{2+} no cambia, mientras que el efecto de Mg^{2+} disminuye bruscamente. La actividad de los hidroxocomplejos aumenta desde Mg^{2+} hasta Sr^{2+} sin pasar por el mínimo en Ca^{2+} como en el caso de BNPP. El aumento de la constante catalítica es proporcional a la constante de acidez de monohidroxocomplejos de los metales. Es probable, que en este caso el monohidróxido de Sr^{2+} , que es una base mas fuerte que los compuestos análogos de Mg^{2+} y Ca^{2+} , acelera en mayor grado la desprotonación del 2-hidroxilo y por lo tanto, la velocidad de la reacción.

El efecto catalítico observado se debe en gran parte a la activación global del sustrato al cambiar el disolvente. Así, la diferencia entre la hidrólisis alcalina y la catalizada por iones de los metales es casi 100 veces menor para Mg^{2+} y Ca^{2+} en comparación con la catálisis de HpNPP. Sin embargo, el ion Sr^{2+} se comporta de una manera anormal, y su actividad comparada con la catálisis básica es 10 veces mayor que en el caso de BNPP.

Probablemente la función de especies catalíticas como base es importante en este sistema, debido a la variación de constante catalítica con el pK_a del metal. Los cambios en velocidad de un metal a otro se asemejan a los observados en el caso de hidrólisis de PNPDP. Sin embargo, las constantes catalíticas de segundo orden son mayores para hidroxocomplejos metálicos que para el catión metálico, por lo que el catión no sólo funciona como base, sino también cumple un importante papel estructural. En este caso la ventaja de nuevo la poseen los iones Sr^{2+} , ya que debido a su gran tamaño pueden acomodar posibles ligantes con mayor facilidad.

11.1.4. Consideraciones generales de efecto de disolvente.

Se puede estimar el efecto del disolvente en términos del cambio de la constante de unión al estado de transición. El cambio en los valores de constantes se presenta en la tabla 11.4.

Tabla 11.4 Constantes de unión en el estado de transición para las reacciones en DMSO.

	$\log K^\ddagger$, BNPP	$\log K^\ddagger$, HpNPP	$\log K^\ddagger$ PNPDP
$Mg(OH)_2$	25.74	22.94009	18.21398
$Ca(OH)^+$	13.51671	12.61122	7.25768
$Sr(OH)^+$	11.76465	12.7685	6.86719

El incremento de las constantes de unión al estado de transición correlaciona bien con el aumento del valor de la constante de formación de hidroxocomplejos con el cambio de disolvente, (capítulo 5). Sin embargo, son mucho mayores que las constantes de unión al sustrato no activado calculadas en el capítulo 5.

La interpretación de los resultados en términos de la constante de unión al estado de transición, indica que el gran efecto catalítico de hidrólisis de HpNPP se explica por el alto grado de activación del sustrato, ya que las constantes de formación de los complejos con estado de transición son parecidas en los casos de BNPP y HpNPP. Las constantes de formación de complejos con el triéster son varios órdenes de magnitud menores que en el caso del diéster. Sin embargo, todos estos valores son mucho más altos que los observados en agua, debido al aumento de las constantes de formación de los hidroxocomplejos.

La especie formada por complejos de Mg^{2+} debe ser descartada, ya que en realidad su estequiometría no está bien definida. Al comparar Ca^{2+} y Sr^{2+} se observa que en términos de unión al estado de transición, Ca^{2+} es mejor catalizador que Sr^{2+} en el caso de la hidrólisis de BNPP y PNPDP, además de que posee la misma actividad que Sr^{2+} para la hidrólisis de HpNPP.

A pesar de que el ion Sr^{2+} es el catalizador más activo, su constante de equilibrio con estado de transición es menor que la de los otros metales. Al mismo tiempo, aunque la actividad catalítica de Sr^{2+} es sorprendente, este ion no puede considerarse como un buen catalizador, ya que funciona a pH básicos aún en DMSO.

La explicación del efecto catalítico de Mg^{2+} es más difícil, ya que los datos cinéticos existentes indican la formación de especies diméricas.

La existencia del dímero podría explicar la existencia de una constante catalítica tan alta, en un sistema donde el nucleófilo está fuertemente desactivado. Además, las formas diméricas son las que se utilizan en las enzimas reales. Existen por lo menos dos estructuras posibles para la especie (Figura 11.1). En el primer caso (Figura 11.1A) la estructura es simétrica, presentando en realidad dos dihidroxocomplejos unidos entre sí por un enlace dipolo. La densidad de carga en este caso sobre los iones metálicos es igual. En este caso el primer centro metálico puede actuar como $MgOH^+$, llevando a cabo la neutralización de la carga sobre el oxígeno del fosfato. El restante $Mg(OH)_3^-$ llevaría a

cabo el ataque nucleofílico al fósforo, ya que en este caso el hidróxido unido al metal no estaría tan desactivado. En el segundo caso (Figura 11.1B) la estructura del dímero sería asimétrica, coordinado uno de los iones metálicos con 4 y otro con 2 hidróxidos. La densidad de carga sobre los hidróxidos en este caso es mayor, y uno de los iones metálicos es más positivo que el otro. El mecanismo de reacción es parecido al primero, sólo que uno de los iones actúa como Mg^{2+} , mientras que otro como $Mg_2(OH)_4$, realizando con mayor facilidad el ataque nucleofílico al fósforo.

Los cálculos semiempíricos a nivel PM3 con el programa Hyperchem 7.5 indicaron que la estructura $Mg_2(OH)_4$ representada en la figura 11.1.B es ligeramente más estable (las energías de las estructuras optimizadas son -853 y -800.4 kcal/mol respectivamente), por lo que el mecanismo de hidrólisis más probable está presentado en la figura 11.1C.

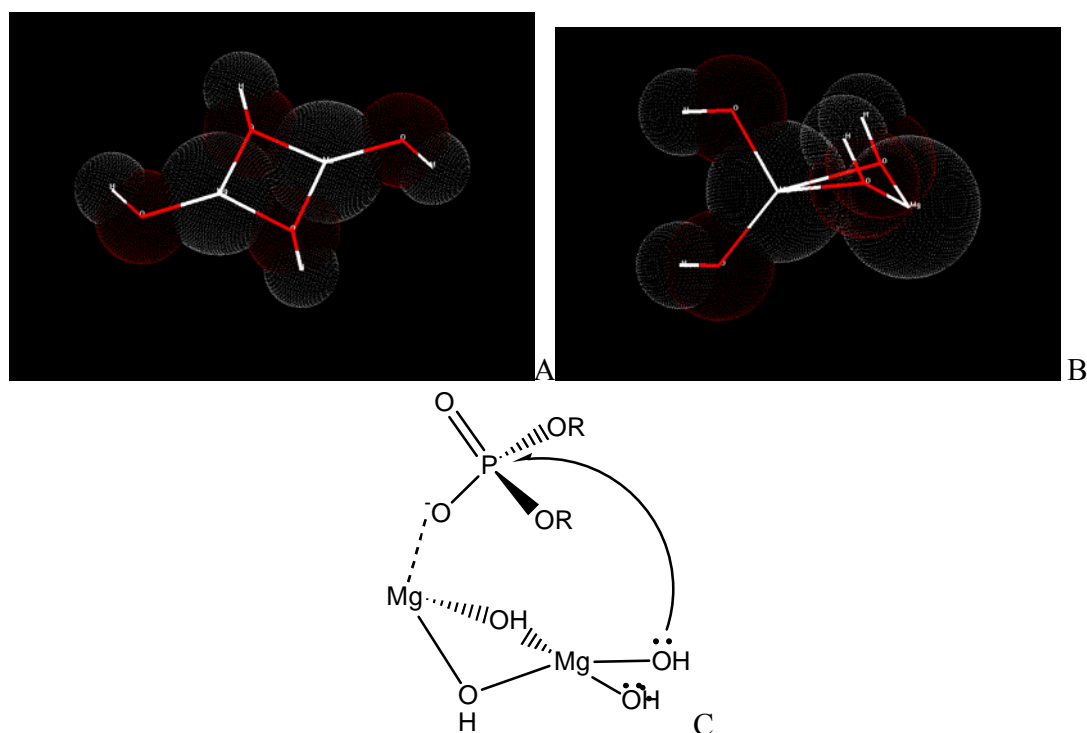


Figura 11.1 A. Dos posibles estructuras del dímero de Mg^{2+} . B. Mecanismo de hidrólisis de diéster fosfato con un dímero de Mg^{2+} .

La primera aproximación hecha al iniciar este proyecto suponía que la constante de velocidad observada aumentaría al incrementar la concentración de las especies activas. En efecto, al cambiar el disolvente la concentración de hidroxocomplejos aumentó. Sin embargo, el simple incremento de la concentración de la especie activa no afectaría la constante catalítica de segundo orden. Por lo cual, el cambio del medio ejerce otro efecto adicional sobre el sistema.

Para una explicación del mecanismo de reacción también se utilizaron cálculos de mecánica cuántica a nivel semiempírico PM3. Se seleccionó como modelo el metal más pequeño, suponiendo que en agua esta solvatado por 6 moléculas de agua, mientras que al cambiar el disolvente la solvatación preferencial es por DMSO. En medio acuoso, el hidroxilo es solvatado por agua en la esfera de coordinación del metal y del disolvente, lo que baja su actividad. Al cambiar el medio por DMSO 90%, el hidróxido coordinado con el metal se libera de los puentes de hidrógeno ejercidos por las aguas de coordinación. La hidratación del hidróxido por el disolvente también disminuiría, ya que la concentración total del agua en el medio es más baja, además de que ahora el hidróxido se encuentra parcialmente protegido por los metilos del DMSO. (Figura 11.2). El cambio en la solvatación también puede ser la explicación del aumento de la rapidez de la reacción al aumentar la concentración del disolvente.

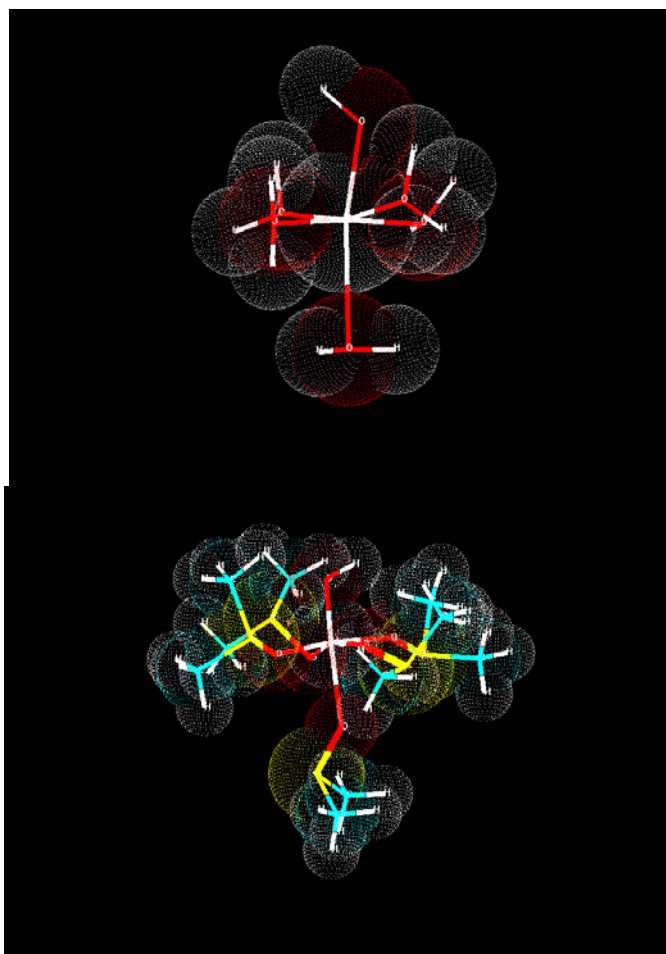


Figura 11.2 Geometría de solvatos de agua y DMSO para un metal alcalinotérreo.

El hidróxido al perder la esfera de coordinación de agua se activa. Sin embargo, la coordinación con metal lo desactiva fuertemente. Esto explica la situación de la hidrólisis del triéster fosfato, donde la actividad de los metales es más baja que la del hidróxido libre y sin embargo, más alta que en agua (donde no se observa reacción).

¿Por que la situación es diferente con diésteres fosfato? Los diésteres fosfato poseen una carga negativa. La interacción entre dos cargas es más fuerte que la interacción entre dipolos, por lo que el diéster fosfato reacciona directamente con el ion metálico, al igual que el hidróxido, pasando a la segunda esfera de coordinación (este mecanismo es válido en el caso de Ca^{2+} y Sr^{2+} que reaccionan con BNPP). Así, el ataque nucleofílico se lleva a cabo de manera intramolecular, lo que aumenta de manera considerable el desempeño del sistema. En el caso de HpNPP es probable que la reacción

también ocurra de manera intermolecular, pero el hidróxido unido al metal ataca al 2-hidroxiopropilo. La creación de este tipo de "Nanoreactor" sería la razón principal del aumento de actividad en este sistema (Figura 11.3)

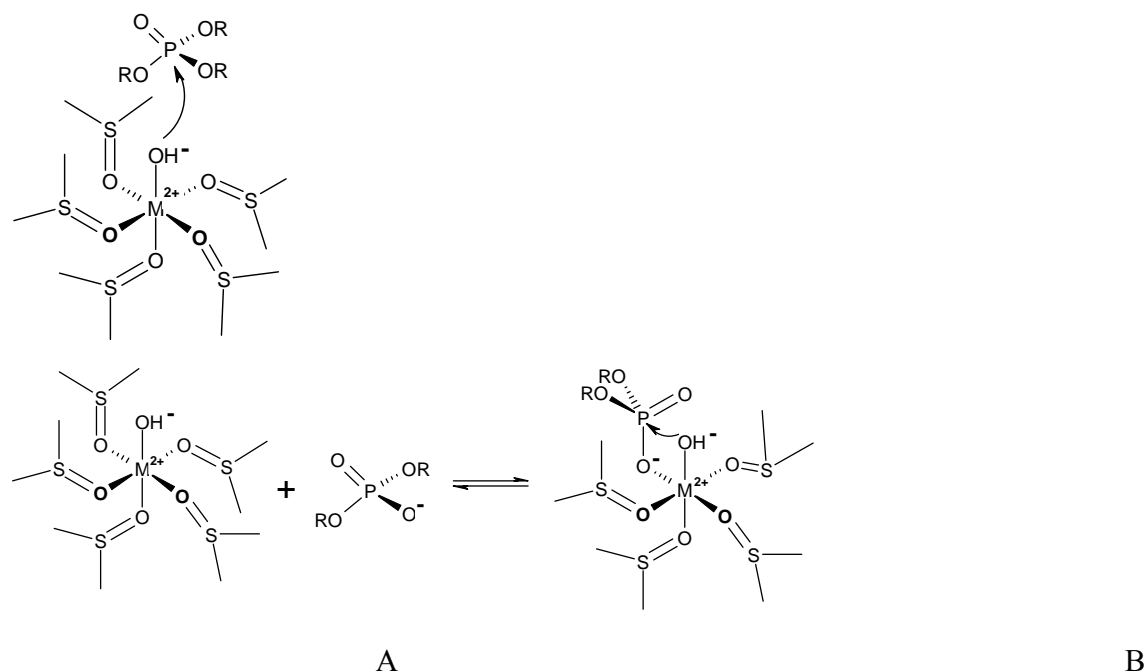


Figura 11.3 Diferencia entre mecanismos inter- e intramolecular para la hidrólisis de tri y diésteres fosfato. La alta eficiencia en la hidrólisis de diésteres fosfato se debe probablemente a la presencia de la reacción intramolecular.

11.2 Futuros proyectos.

Los resultados obtenidos en este trabajo requieren de futuros estudios. Es necesaria la elucidación de las estructuras de los metales alcalinotérreos en el disolvente. Sin embargo, debido a que la espectroscopía para metales alcalinotérreos es casi nula, es probable que un estudio teórico satisfaga mejor este problema.

El sistema resultó muy eficiente con los sustratos modelo de ADN y ARN. Sin embargo, una evaluación de la actividad de los complejos con ADN y ARN reales es necesaria. En el caso de la alta actividad hidrolítica es necesario diseñar experimentos de

reconocimiento de secuencias específicas por metales alcalinotérreos. El diseño de un sistema eficiente podría tener amplias aplicaciones prácticas.

El sistema funciona en un disolvente orgánico, que difiere mucho de ser un medio natural. Es necesario un esfuerzo para crear complejos activos en agua. Esto puede ser logrado utilizando nanoreactores⁽⁵⁴⁾ solubles en agua que crearían un microambiente alrededor de los cationes. Varias aproximaciones son posibles, entre ellas, el uso de micelas, polímeros solubles en agua o ligantes de alto peso molecular, tipo dendrímeros o ésteres corona, los cuales podrían solvatar el metal, creando condiciones específicas a su alrededor. Este tipo de estudio necesitaría los valores de constantes de unión de metal-ligante y tal vez conlleve a la síntesis de nuevos ligantes con propiedades variables.

Existen indicaciones de que el sistema es un buen modelo del interior de la enzima hidrolítica. Los metales alcalinotérreos son más activos en ella que los metales de transición. El ion Mg^{2+} siendo un dímero actúa mejor que el ion monomérico Ca^{2+} , aunque en agua, donde todas las especies son monoméricas, estas secuencias se invierten, el sistema funciona a bajos valores de OH^- , en un pH neutro o débilmente básico. Es necesario un estudio teórico extenso para ver que tan parecidas podrían ser las estructuras de la enzima y del disolvente. Probablemente, se encontró un medio adecuado y bastante simple para ver el comportamiento enzimático primitivo. Es también probable, que un medio parecido existía en la Tierra prebiótica y aceleraciones de reacción selectivas de este tipo hicieron posible la existencia de vida en la Tierra.

Capítulo 12

Conclusiones

- Ha sido estudiada la cinética de la hidrólisis de tres tipos de ésteres fosfato, un fosfodiéster (BNPP, un sustrato modelo para hidrólisis de ADN), un fosfodiéster con un grupo β -hidroxilo (HpNPP, un sustrato modelo para hidrólisis de ARN) y un fosfotriéster (PNPDPP, un sustrato modelo para hidrólisis de pesticidas a base de ésteres fosfato) en presencia de iones de metales alcalinotérreos (Mg^{2+} , Ca^{2+} y Sr^{2+}) en agua y en DMSO acuoso en un amplio intervalo de pH.
- En agua las especies metálicas activas son hidroxocomplejos mononucleares $M(OH)^+$, los cuales poseen mayor reactividad que el ion hidróxido libre respecto a fosfodiésteres, por aproximadamente un orden de magnitud. Sin embargo, debido a las bajas concentraciones de los hidroxocomplejos en agua, la catálisis con metales alcalinotérreos es poco eficiente. La reactividad de los complejos $M(OH)^+$ respecto del fosfotriéster es menor que la presentada por el hidróxido libre.
- La composición y estabilidad de hidroxocomplejos metálicos en DMSO 90% fue determinada mediante titulaciones potenciométricas y conductimétricas. Se observó un aumento considerable en la estabilidad de hidroxocomplejos en este medio y se tuvo la formación de algunas especies que no se encuentran en disolución acuosa. En el intervalo de pH neutro y ligeramente básico para Mg la especie principal es $M(OH)_2$ mientras que para Ca y Sr se forman cantidades notables de especies $M_2(OH)^{3+}$ y $M(OH)^+$. La comparación de los perfiles de las velocidades de hidrólisis para los tres sustratos como función de las concentraciones de metal e hidróxido con diagramas de distribución de las especies calculadas para cada catión, demostrando que las formas activas son $Mg(OH)_2$, $Ca(OH)^+$ y $Sr(OH)^+$ respectivamente.

- La reactividad de los hidroxocomplejos para la ruptura de fosfodiésteres en DMSO acuoso es hasta cuatro órdenes de magnitud más alta que la reactividad del hidróxido libre. Con el triéster como el sustrato, la reactividad de hidroxocomplejos en DMSO acuoso es considerablemente menor que la del hidróxido libre, tal como se observa en agua.
- El efecto conjunto del aumento grande de la concentración de los hidroxocomplejos debido a su mayor estabilidad y de mayor reactividad intrínseca de estos complejos en el medio de DMSO acuoso hace que la eficiencia de la catálisis en la ruptura de fosfodiésteres crezca enormemente, comparando con la actividad en agua. La velocidad de hidrólisis observada crece hasta seis órdenes de magnitud en presencia de metales alcalinotérreos en concentraciones milimolares en DMSO mientras que en agua el efecto catalítico apenas llega a un orden de magnitud en presencia de sales a concentraciones ~ 0.1 M. En particular, con HpNPP como el sustrato, la constante de velocidad de segundo orden en presencia de Sr^{2+} en DMSO alcanza el valor de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cercano al nivel de actividad enzimática, lo cual, nunca no ha sido observado en sistemas artificiales.
- La actividad de metales alcalinotérreos presenta patrones de comportamiento diferentes para cada sustrato. Así, en el caso de HPNPP y PNPDPDP la especie mas activa es Sr^{2+} , y la actividad de hidroxocomplejos disminuye de Sr^{2+} a Mg^{2+} . En el caso de BNPP la especie mas activa es el hidroxocomplejo de Mg^{2+} y se observa un mínimo en el ion Ca^{2+} . En general, se observan dos tendencias importantes: la basicidad del hidróxido unido al metal (que afecta en mayor grado hidrólisis de HPNPP y PNPDPDP) y capacidad de unión al estado de transición de la especie catalítica (es el factor mas importante para la hidrólisis de BNPP). La suma de estos dos efectos da como resultado la aceleración total de la hidrólisis.
- Se propone que la alta actividad catalítica se deba a la formación de un medio con propiedades dieléctricas específicas, creado gracias a la solvatación preferencial de metales alcalinotérreos por moléculas de DMSO.

Bibliografía

- (1) A.K. Yatsimirsky, H-J.Schneider, in. "Metal ions in biological systems" Ed. A. Siegel, H. Siegel, **2003 Vol. 40** pp 369-463
- (2) (a) J.R.Cox, Jr. and O.B.Ramsay, **1964**, *Chem.Rev.*, **64**, 317-352 ; (b) T.C.Bruice and S.J. Benkovic, **1966**, *Bioorganic Mechanisms*, **2**, New York.; (c)F.H.Westheimer, **1968**, *Acc.Chem.Res.*, **1**, 70-78; (d) G.R.J.Thatcher and R.Kluger, **1989**, *Adv.Phys.Org.Chem.*, **25**, 99;
- (3) (a) E. Bamann, M. Meisenheimer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1938**, **71B**, 1711-2068; (b) W.W. Butcher, F. H. Westheimer, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1955**, **77**, 2420-2424.
- (4) A. K. Yatsimirsky, *Coord. Chem. Rev.*, **2005**, **249**, 1997-2011
- (5) A.J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. S. B* **1970**, 1165
- (6) S. H. Gellman, R. Petter and R. Breslow, *J. Amer. Chem. Soc.* **1986**, **108**, 2388-2394
- (7) (a)N. H. Williams, B. Takasaki, M.Wall, and J. Chin, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, **32**, 485-493; (b) N. H. Williams and P. Wyman, *Chem. Comm.*, **2001**, 1268-1269
- (8) J. Morrow , O. Iranzo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, **8**, 192-200
- (9) (a) Clifford A. Bunton and S. J. Farber *J. Org. Chem.*, **1969** **34**,767-772; (b) J.A.A. Ketelaar, H.R. Gersmann, *Rec. Trav. Chim.* **1958**, **77**, 973; (c) A.J. Kirby, M. Yonas *J. Chem. S. B* , **1970**, 510; (d)M. Yang, J.P. Richard, J.R. Morrow, *Chem. Commun.* **2003** 2832; (e) M.J. Young, J. Chin *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, **117**, 10577. (f) C.A. Bunton, S.J. Farber and E.J. Fendler *J. Org. Chem*, **1968**, 29
- (10) Ronald Kluger, Richard W. Loo, and Vince Mazza, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, **119**, 12089-12094
- (11) T. Dudev, C. Lim *Chem Rev* **2003**, **103**, 773-787
- (12) J. A. Cowan *JBIC*, **1997**, **2**, 168-176
- (13) John J. Perona *Methods* **2002**, **28**, 353-364
- (14) Dean E. Wilcox, *Chem. Rev.* **1996**, **96**, 2435-2458
- (15) David MJ Lilley, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, **15**, 313-323
- (16) Faqing Huang and Michael Yarus, *Biochemistry* **1997**, **36**, 14107-14119

- (17) (a) Rhonda A. Torres, Fahmi Himo, Thomas C. Bruice, Louis Noodleman, and Timothy Lovell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9861-9867 (b) Arnold HampeV and JA Cowan, *Chemistry & Biology*, **1997**, *4*, 513-517
- (18) David J. Weber, Alan K. Meeker, and Albert S. Mildvan, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 6103-6114
- (19) W.J. Donarski, D.P. Dumas, D.P. Heitmeyer, V.E. Lewis, FM. Raushel *Biochemistry*. **1989**, *28*, 4650-5
- (20) R.M. Smith and A.E. Martell, "Critical Stability Constants", Plenum Press, New York, 1976, Vol.4
- (21) M.M. Benning, J.M. Kuo, F.M. Raushel, H.M. Holden *Biochemistry*, **1995**, *34*, 7973-8.
- (22) [Yang P](#), et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9* 495-506
- (23) Morio Yashiro, Maiko Higuchi, Yusuke Washizu, and Makoto Komiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2002**, *75*, 1843-1844
- (24) J. R. Morrow, L. A. Buttrey, and K. A. Berback, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 16-20
- (25) Jan Wrzesinski, Daniel Michatowski, Jerzy Ciesiolka, Wlodzimierz J. Krzyzosiak *FEBS Letters*, **1995**, *374*, 62-68
- (26) Joanne W. Yun, Tomoaki Tanase, and Stephen J. Lippard, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7590-7600
- (27) Cacciapaglia, R; Di Stefano, S; Mandolini, L J. *Org. Chem.*, **2001**, *66*, 5926-5928
- (28) Olga Taran Iourova, "Hidrólisis de diesteres fosfato en presencia de metales alcalinotérreos", tesis de licenciatura, UNAM, **2004**
- (29) O. Taran, A.K. Yatsimirsky, *Chemical Communications*, **2004**, 1228-1229
- (30) A. J. Parker, *Chem. Rev.*, **1969**, *69-1*, 1-32.
- (31) (a) M. Chaudhry, Y. Kinjo, I. Persson *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1994**, *90*, 2683-2689 (b) E. Buncel, H. Wilson, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **1977**, *14*, 133-201
- (32) E. China, S. Dominguez et al. *Main Group Metal Chem.*, **1997**, *20*, 11-17
- (33) JM: Harrowfield, WR Richmond, BW Skelton, AH White, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 227-230
- (34) E. V. Vinogradov, P. R. Smirnov, V. N. Trostin, *Rus. Chem. Bull. Intern. Ed.* **2003**, *52*, 1253-1271

- (35) A-S. Ullstroe, D. Warminska, I. Persson, *J. Coord. Chem.*, **2005**, *58*, 611–622
- (36) S. Kluge, J. Weston, *Biochemistry* **2005**; *44*: 4877-4885.
- (37) Y. S. Badyal, A. C. Barnes, G. J. Cuello, J.M. Simonson *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 11819-11827
- (38) G. Moreau, R. Scopelliti, L. Helm, J. Purans, A.E. Merbach, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 9612-9622
- (39) Brown, D. M.; Usher, D. A. *J. Chem. Soc.* **1965**, 6558-6564.
- (40) Gulick, W. M.; Geske, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2928.
- (41) V. A. Mikhailov, G. Akibo-Betts, and A. J. Stace *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 8583-8589
- (42) (a) Smith, H. G.. *Acta Cryst.* **1953**, *6*, 604–609, (b) J. S. Ricci, R. C. Stevens, R. K. McMullanc, W. T. Kloosterc, *Acta Crystallographica Section B*, **2005**, 381-386
- (43) A. S. Petrov, J. Funseth-Smotzer, G. R. Pack *Intern. J. Quantum Chem.*, **2005**, *102*, 645–655
- (44) H. Sigel, K. H. Scheller and B. Prijs, *Inorg. Chim. Acta*, **1982**, *66*, 147-155
- (45) P. K. Grzyska, P.G. Czyryca, J. Golightly, K. Small, P. Larsen, R. H. Hoff, A.C. Hengge *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1214-1220
- (46) Richard M. Tarkka and Erwin Buncel. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1503-1507
- (47) F. Tanaka, Y. Kawasaki, S. Yamashita, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1.*, **1988**, *84*, 1083-1090
- (48) E. Anslyn, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4473–4482.
- (49) A. M. Piatek, M. Gray, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9879
- (50) Todor Dudev, J. A. Cowan, C. Lim *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7665-7673
- (51) Por ejemplo, <http://www.mgwater.com>, <http://www.calciuminfo.com>
- (52) K. J. Laidler “*Chemical Kinetics*”, **1987**, 3rd Ed., HarperCollinsPublisher
- (53) A. Jojansson, S. Johansson, *Analyst*, **1978**, *103*, 305
- (54) P. Fiordiponti, F. Rallo, F. Rodante, *Z. Phys. Chem. N.F.*, 1974, **88**, 149
- (55) E. Bosh, G. Fonrodona, C. Ráfols, M. Rosés, *Analyt. Chim. Acta*, 1997, 349, 367-376.
- (56) D.A. Skoog y D.M. West, “*Análisis Instrumental*”, 1987, 2^a Ed.. Editorial Interamericana.

-
- (57) T.Koike and E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, *113*, 8935-8941
- (58) a) J. E. Huheey *Química inorgánica: principios de estructura y reactividad*. **1981**, 2ª Ed. México. Harla, b) R.S. Drago, B.B Wayland, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 3571
- (59) S. S. Massoud and H. Sigel, *Inorg. Chem.* 1988, *27*, 1447-1453
- (60) P. Gomez-Tagle, A.K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3786.
- (61) O. Iranzo, A.Y. Kovalevsky, J.R. Morrow, J.P. Richard, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* 1988.

Anexo 2

Ajustes realizados con el programa Hyperquad2000 a las curvas de titulación potenciométrica de metales alcalinotérreos con Bu_4NOH

A2.1. Titulaciones potenciométricas de ion Mg^{2+} con Bu_4NOH 0.09856 M

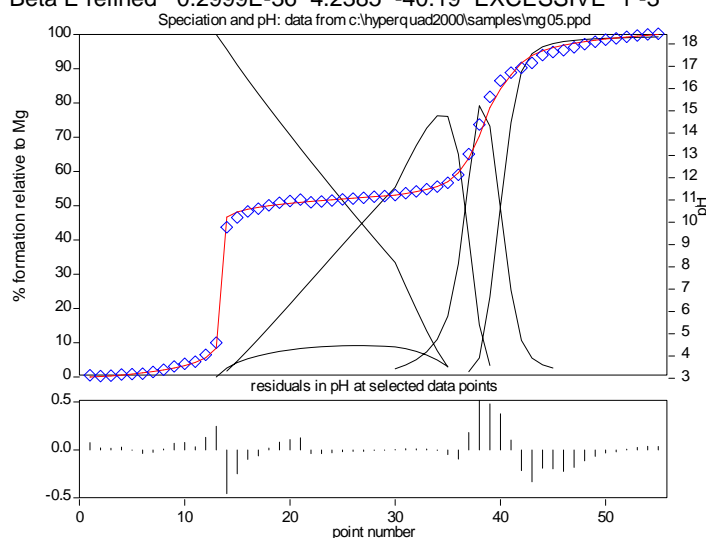
0.5 mM Mg

Chi-squared = 135.69

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 14.1273

	Value	relative	log	standard	
	std devn	beta	deviation		
Beta A refined	0.3654E-21	0.2875	-21.9373	0.1249	0 -1
Beta B refined	0.1588E-11	7.0529	-11.3793	EXCESSIVE	1 -1
Beta C refined	0.6043E-22	0.7198	-22.6187	EXCESSIVE	1 -2
Beta E refined	0.2999E-36	4.2385	-40.19	EXCESSIVE	1 -3



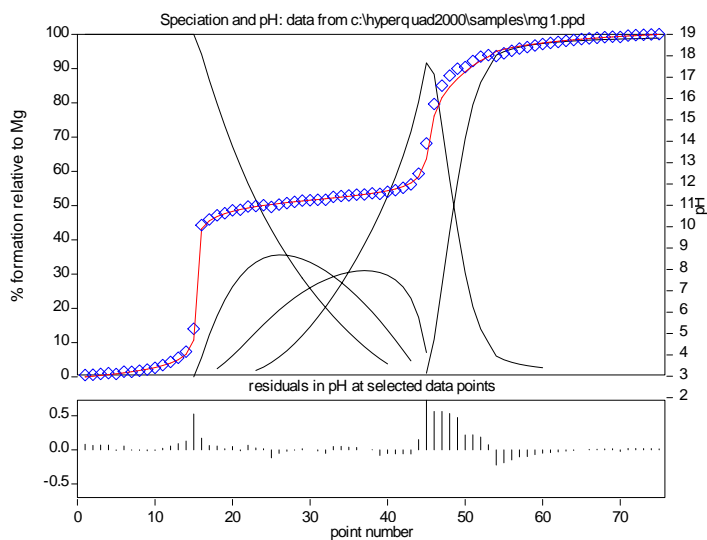
Mg 1 mM

Chi-squared = 25.59

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 3.9825

	Value	relative	log	standard	
	std devn	beta	deviation		
Beta A refined	0.1750E-21	0.0210	-21.7571	0.0091	0 -1
Beta B refined	0.7451E-11	0.4725	-11.54	EXCESSIVE	1 -1
Beta C refined	0.3331E-22	0.3236	-22.4775	0.1405	1 -2
Beta E refined	0.3476E-36	0.3517	-40.53	EXCESSIVE	1 -3

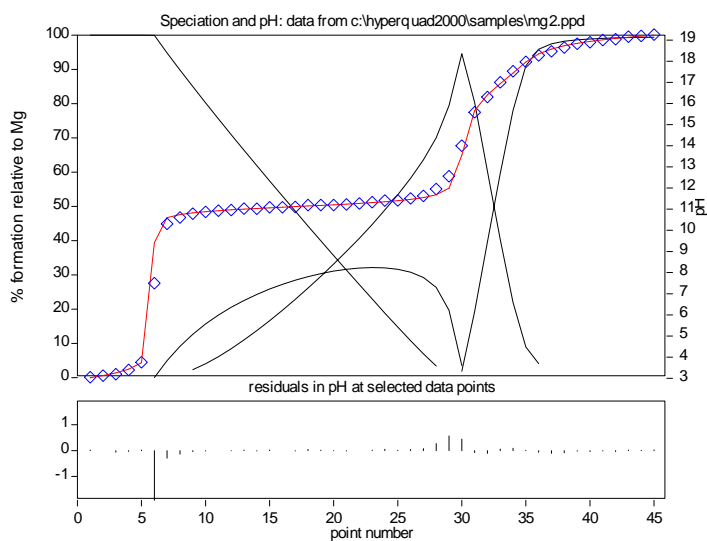


Mg 2 mM

Results page Run timed at 16.36 on 18 Feb 2005
 new project
 14 iterations
 Refinement successful
 Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 2.9626

	Value	relative	log	standard	
	std devn	beta	deviation		
Beta A refined	0.1040E-21	0.0347	-22.2529	0.0151	0 -1
Beta C refined	0.2965E-22	0.3460	-22.2579	EXCESSIVE	1 -2
Beta D refined	0.7627E-53	0.3465	-59.1876	EXCESSIVE	2 -5
Beta E refined	0.5126E-36	0.2768	-40.5302	0.1202	1 -3



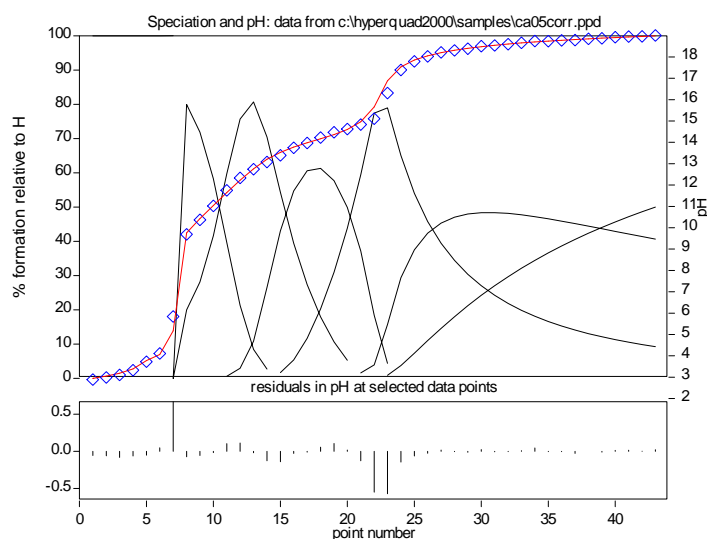
A2.2. Titulaciones potenciométricas de ion Ca^{2+} con Bu_4NOH 0.1108 M

0.5 mM

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 3.7391, Bu4NOH 0.1207 M

	Value	relative	log	standard	
	std devn	beta	deviation		
Beta A constant	0.1445E-21		-22.0100		-1 0
Beta B refined	0.7597E-7	3.5643	-9.2394	EXCESSIVE	-1 2
Beta C refined	0.6912E-11	1.3286	-12.8504	EXCESSIVE	-1 1
Beta D refined	0.8059E-25	1.5191	-27.34937	EXCESSIVE	-2 1
Beta E refined	0.2213E-61	2.8194	-70.73	EXCESSIVE	-5 2



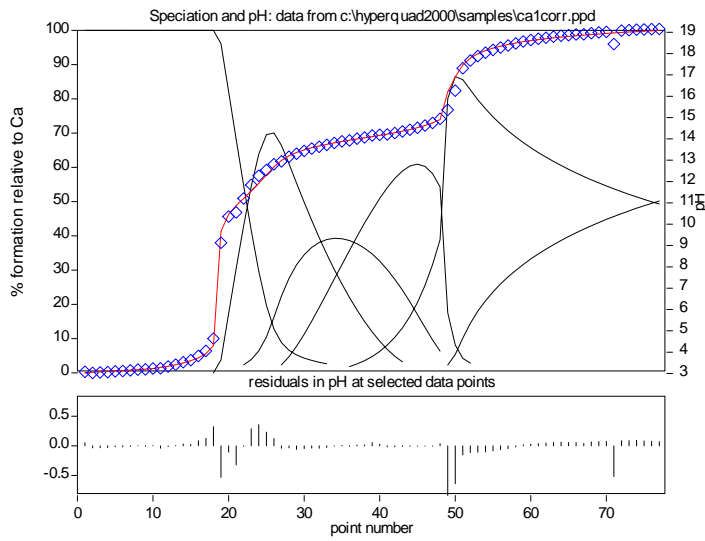
Ca 1 mM

Chi-squared = 113.86

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 5.4040,

	Value	relative	log	standard	
	std devn	beta	deviation		
Beta A constant	0.1258E-21		-21.9303		0 -1
Beta B refined	0.4777E-8	1.1520	-8.0208	EXCESSIVE	2 -1
Beta C refined	0.2618E-12	0.5820	-11.6820	EXCESSIVE	1 -1
Beta D refined	0.2799E-26	0.5333	-26.0830	EXCESSIVE	1 -2
Beta E refined	0.7122E-65	1.0339	-67.8274	EXCESSIVE	2 -5

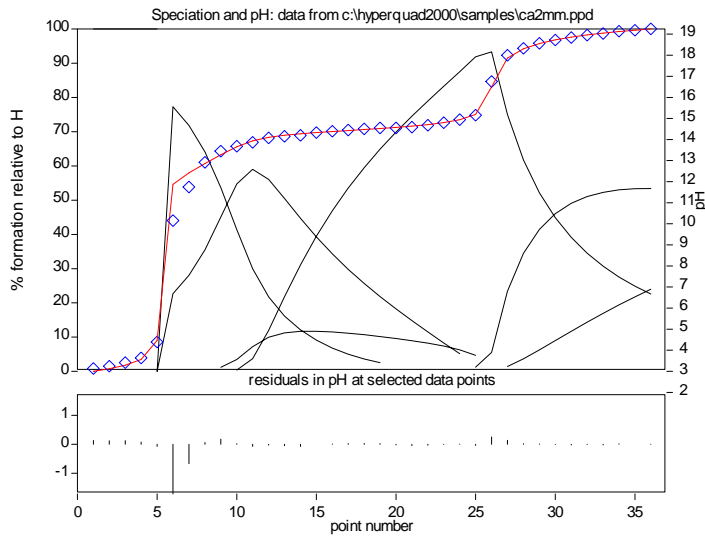


Ca 2 mM

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 2.8811

	Value	relative	log	standard		
	std devn	beta	deviation			
Beta A constant	0.9530E-22	-21.8209	-1	0		
Beta B refined	0.8184E-10	0.9539	-7.8	EXCESSIVE	-1	2
Beta C refined	0.3883E-13	0.2247	-11.7108	0.0976	-1	1
Beta D refined	0.2723E-28	1.5609	-26.0649	EXCESSIVE	-2	1
Beta E refined	0.3464E-67	0.4341	-67.4604	EXCESSIVE	-5	2



A2.3. Titulaciones potenciométricas de ion Sr^{2+} con Bu_4NOH 0.1025 M

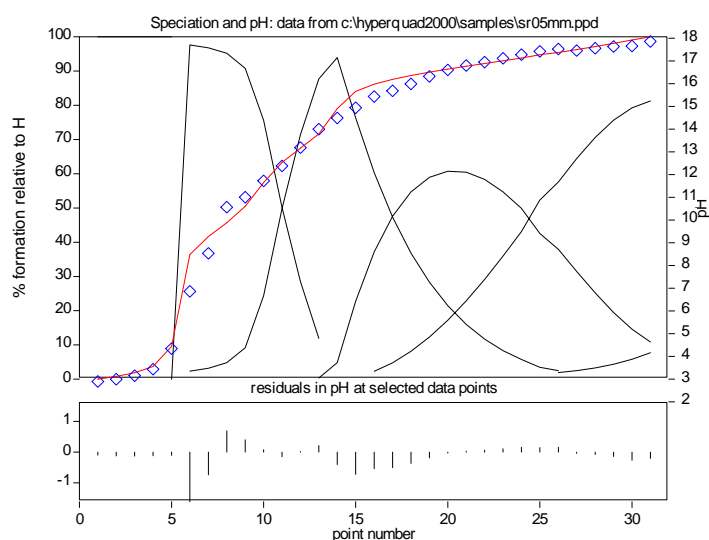
Sr 0.5 mM

Results page Run timed at 15.02 on 18 Feb 2005
 new project
 5 iterations

Refinement successful
 Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 2.0918

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-22		-22.0000		-1 0
Beta B refined	0.3893E-6	1.8607	-6.4097	EXCESSIVE	-1 2
Beta C refined	0.4247E-11	0.9661	-11.3720	EXCESSIVE	-1 1
Beta D refined	0.1368E-27	1.0403	-27.8639	EXCESSIVE	-2 1
Beta E constant	1.0000E-76		-76.0000		-5 2
Beta F refined	0.5888E-45	1.0109	-45.2300	EXCESSIVE	-3 1



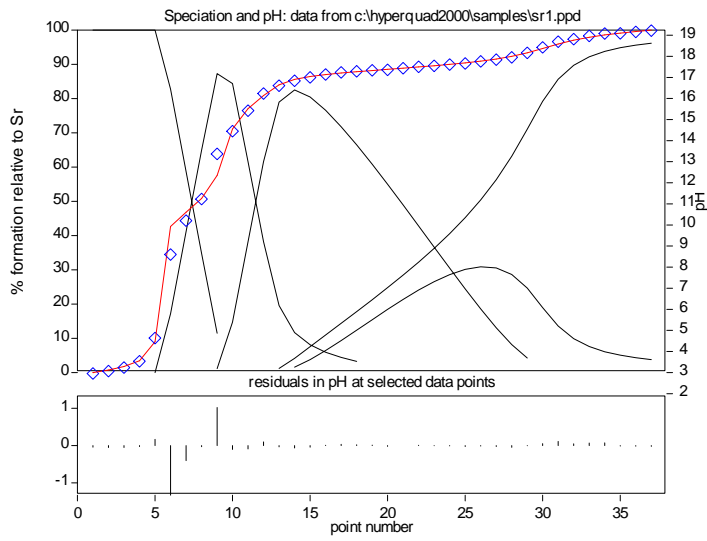
Sr 1 mM

Results page Run timed at 19.27 on 11 Feb 2005
 new project
 1 iterations

Refinement successful
 Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 1.2889

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation	
Beta A constant	0.4661E-22		-22.3315		0 -1
Beta B refined	0.1490E-7	0.8457	-7.8267	EXCESSIVE	2 -1
Beta C refined	0.4597E-13	0.4473	-13.3375	EXCESSIVE	1 -1
Beta D refined	0.4666E-76	0.8978	-76.3311	EXCESSIVE	2 -5
Beta E refined	0.3547E-48	0.4489	-48.4501	EXCESSIVE	1 -3



Sr 2 mM

Results page Run timed at 19.35 on 11 Feb 2005
 new project
 6 iterations
 Refinement successful
 Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 3.2475

	Value	relative	log	standard	
	std devn	beta	deviation		
Beta A refined	0.3955E-21	0.0212	-21.4028	0.0092	0 -1
Beta B refined	0.1269E-9	1.3195	-9.8966	EXCESSIVE	2 -1
Beta C refined	0.1398E-14	0.6571	-14.8546	EXCESSIVE	1 -1
Beta D refined	0.1566E-75	1.3077	-75.8052	EXCESSIVE	2 -5
Beta E refined	0.1161E-47	0.6564	-47.9350	EXCESSIVE	1 -3

